

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Patricia de Castro Duarte

**Associação entre síndrome metabólica e estresse oxidativo/nitrosativo  
lamelar em equinos submetidos a dieta rica em carboidratos não estruturais**

**Belo Horizonte**  
**2021**

Patricia de Castro Duarte

**Associação entre síndrome metabólica e estresse oxidativo/nitrosativo lamelar em equinos submetidos a dieta rica em carboidratos não estruturais**

**Versão final**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

**Área de Concentração:** Clínica e Cirurgia Veterinárias.

**Orientador:** Prof. Dr. Rafael Resende Faleiros.

**Co-orientadores:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabíola Oliveira Paes Leme.

Prof. Dr. Luiz Claudio Nogueira

Mendes

**Belo Horizonte  
2021**

D812a Duarte, Patrícia de Castro. 1990-  
Associação entre síndrome metabólica e estresse oxidativo/nitrosativo lamelar em equinos submetidos a dieta rica em carboidratos não estruturais / Patrícia de Castro Duarte. – 2021.

148 f.il.

Orientador: Rafael Resende Faleiros.

Coorientadores: Fabíola Oliveira Paes Leme

Luiz Claudio Nogueira Mendes.

Tese (Doutorado) - Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias.

Bibliografia: f: 28-29; f:54-68; f:77-80; f:112-121; f:144-147.

1. Equinos - Mangalarga Marchador - Teses – 2. Laminite - Doenças - Teses – 3. Obesidade – Teses – 4. Distúrbios do metabolismo – Teses – I. Faleiros, Rafael Resende – II. Leme, Fabíola Oliveira Paes – III . Mendes, Luiz Claudio Nogueira – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**PATRÍCIA DE CASTRO DUARTE**

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 Clínica e Cirurgia Veterinárias. Aprovada em 10 de fevereiro de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Rafael Resende Faleiros - Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Luciane Maria Laskoski

Dr.(a). Geraldo Eleno Silveira Alves

Dr.(a). Tiago Facury Moreira

Dr.(a). Armando de Mattos Carvalho



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Resende Faleiros, Professor do Magistério Superior**, em 10/02/2021, às 20:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Facury Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 11/02/2021, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciane Maria Laskoski, Usuário Externo**, em 11/02/2021, às 08:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Armando de Mattos Carvalho, Subchefe de departamento**, em 11/02/2021, às 09:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Eleno Silveira Alves, Usuário Externo**, em 11/02/2021, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0560254** e o código CRC **7D874956**.

12/02/2021

SEI/UFMG - 0560254 - Folha de Aprovação

---

**Referência:** Processo nº 23072.200413/2021-87

SEI nº 0560254

*Dedico esta tese aos meus pais,  
Marivane e Francisco, e seu amor  
incondicional.*

## Agradecimentos

Inicialmente agradeço a Deus e aos mentores espirituais, que foram bastante solicitados por mim durante este período, e sempre estiveram presentes. Descobri uma força que até então eu não sabia que tinha, e que não foi construída sozinha, mas com todo o amparo que sinto dentro da minha fé, encarnada também na forma de tantas pessoas especiais que cruzaram meu caminho.

Dentro destes quatro anos a gratidão foi mais que um exercício de civilidade, mas uma bênção no meio das atribulações, onde tantos amigos me auxiliaram e foram determinantes para minha carreira, para minha família, para minha saúde física e mental. E, aproveitando o gancho, agradeço ao psicólogo e hipnoterapeuta Flávio Patrick, que me ensinou a lidar com os problemas de forma paciente e prática.

Durante os últimos quatro anos me mudei sete vezes, fui servidora em três universidades federais, me tornei mãe, acompanhei e ainda acompanho a trajetória do meu pai após sofrer um AVC, passei pelas disciplinas, qualificações, indecisões experimentais e estatísticas do doutorado e agora, ao final, estamos todos enfrentando a pandemia do novo coronavírus. Portanto, meus agradecimentos aqui podem ser extensos, mas, mesmo assim, insuficientes.

Agradeço aos meus pais, Marivane e Francisco, e irmãos, César e Marília, que sempre me apoiaram e estiveram presentes. Com o nascimento da Beatriz eles se tornaram avós e tios babões, e me auxiliaram no que puderam e no que não puderam nos períodos em que eu e o Ivan moramos em cidades diferentes. Agradeço aos meus pais por todo o apoio e aproveitamento para reiterar, para que fiquem tranquilos, que em cada passo dado em meio a tantas atribulações, eu tive a certeza de estar pisando no caminho que Deus havia traçado antes de eu sequer planejar tirar um dos pés do chão. E, enquanto eu escrevo estes agradecimentos, espero com todas as forças do coração ter a oportunidade de ainda contar com a participação de ambos na minha vida por muitos e muitos anos. Pai e mãe, por favor cuidem da sua saúde física e mental, porque esta nossa jornada está longe de acabar. Agradeço a minhas cunhadas Ana, Márcia e Janaína e a meus sogros Heidilcio e Lúcia, sempre presentes, participativos, carinhosos e torcendo pelo meu sucesso, assim como eu torço pelo deles. Gratidão aos meus avós, *in memoriam*, em especial a dona Teresinha que nos deixou este ano, e, mesmo sendo tão diferente de mim, nunca deixou faltar o amor, a bênção e o colo. E obrigada às minhas tias, tios, primas e primos, madrinhas e padrinho. Porque minha família não é enorme somente em número. E, “se vi mais longe”, foi por causa destes “ombros de gigantes” também.

Gratidão à Beatriz por ter nos escolhido como pais. Sua vinda inesperada nos ensinou e ajudou a fortalecer ainda mais os laços das nossas famílias. Muitas coisas boas aconteceram graças a ela. Problemas que antes pareceriam impossíveis tornaram-se pequenos diante da imensurável beleza e responsabilidade de criar um ser humano. Espero que seja cada vez mais comum mães tornarem-se graduadas, pós-graduadas, doutoras. Que seja natural contar com o apoio da família e da sociedade para criar os filhos, e que exista uma valorização da instituição familiar no sentido real da palavra. Que a experiência incrível da maternidade venha junto com a reafirmação da nossa individualidade e nossa carreira, sem que uma coisa contraponha ou anule a outra.

Agradeço ao Ivan, que me acompanhou novamente em uma das minhas pós-graduações, mas desta vez em um nível absurdo de complexidade. Tornou-se marido à distância, tornou-se pai, viajou praticamente toda semana nos últimos três anos, embalou nossa bebê recém-nascida enquanto eu estava dentro do laboratório, me ajudou nas sete mudanças, correu atrás dos próprios sonhos enquanto contribuía para que eu corresse atrás dos meus. Espero que continuemos a realizar muitas coisas juntos. Te amo!

Agradeço ao professor Rafael Faleiros, que, como nós, orientados, costumamos brincar, é nosso pai também. No meio de tantas atribuições, provavelmente ele foi mais um pai que um orientador mesmo. Tenho a sensação de me repetir nos agradecimentos a ele, lembrando do mestrado, mas, como eu falei, ainda assim provavelmente os agradecimentos nunca serão suficientes. Porque o professor Rafael é assim: ele enxerga o todo, e não só a parcela. Em um mundo mergulhado em tantos problemas psicológicos causados pela busca de resultados acelerados, ele equilibra a pressão para que melhoremos, mas não enlouqueçamos (muito, rs) no processo. E nesse tocante aproveito para incluir a professora Fabíola, co-orientadora mãezona, presente, eficiente, cientista.

Agradeço aos professores que auxiliaram no meu crescimento profissional neste período por meio das disciplinas da pós graduação, grupo de estudo Nerum e grupo de pesquisa Equinova, participações nas bancas, contribuições nos delineamentos experimentais cogitados e nos executados: professor Geraldo Eleno Silveira Alves, professor Armando Carvalho, professora Andressa Xavier, professor Luiz Cláudio Nogueira, professora Raffaella Teixeira, professor Rodrigo Meneses, professora Britta Leise, professor Alan Machado, professora Lúcia Pimenta, professor José Dias, professor Tiago Facury.

Obrigada ao colega Rodrigo Ribeiro, hoje professor, por ter me fornecido tanto material para trabalhar durante meu doutorado, e por tantas dicas e conhecimento compartilhado. Te desejo todo o sucesso como pesquisador, e espero que nosso país no futuro valorize esta profissão, para que pessoas com tanta sede de saber e sonhadoras como você possam desenvolver todo o seu potencial.

Obrigada à professora Luciane Laskoski pelas análises de estresse oxidativo lamelar, que foram o ponto de partida para conclusões bastante relevantes apresentadas nesta tese, e obrigada por ter aceitado fazer parte da banca.

Agradeço ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida nos primeiros meses do doutorado, e ao SIMCAV, à CAPES e à Fapemig que financiam ou financiaram equipamentos, bolsas e outros gastos diretos e indiretos que tivemos durante as pesquisas.

Agradeço aos meus colegas da pós-graduação pelo apoio nos estudos, amizade, favores (que foram muitos), companhia nos experimentos e confraternizações: Cahuê Paz, Álvaro Oliveira, Jaci Almeida, Antônio Catunda, Marcos Paulo Lima, Bruno Malacarne, Heloisa Pedrosa, Mayara Gomes, Jessica Fontana, Letícia Cota, Isabella Winter, Jorge Tiburcio, Barbara Okano, Daniela Paína, Ronaldo Martins e Matheus Loes. Destaque aos meus colegas de república (em três lares diferentes) Daniela, Álvaro, Cahuê, Jaci e Barbara. Com certeza temos muita história para contar e uma amizade para a vida.

Gratidão a tantas pessoas com quem trabalhei nestes quatro anos e me acrescentaram exemplos, fizeram eu me sentir parte de um lugar. Não citarei os nomes para não correr o risco de esquecer de citar alguém e também não tornar esta seção o maior dos capítulos da tese. Mas quero registrar agradecimento aos colegas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus Unaí, do Hospital Veterinário de Grandes Animais da Universidade de Brasília (Hvetão) e do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais.

E, por último, mas não menos importante, agradeço aos animais, a eterna inspiração da minha profissão. Especialmente aos cavalos, que encantam o ser humano há tantos milênios com sua perfeição, força e bondade, e comigo não haveria de ser diferente. Que a ciência evolua sempre para que a relação homem-animal seja cada dia melhor.

Obrigada!

---

## SUMÁRIO

---

RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	25
INTRODUÇÃO GERAL .....	26
Hipótese .....	27
Objetivo geral .....	27
Objetivos específicos .....	27
Referências bibliográficas.....	28
CAPÍTULO 1 – Causas e métodos diagnósticos da síndrome metabólica equina (SME) - revisão de literatura.....	30
1.1 Introdução .....	30
1.2 Causas da Síndrome Metabólica Equina .....	30
1.2.1 Causas endócrinas.....	31
1.2.2 Causas metabólicas .....	38
1.2.3 Causas genéticas .....	39
1.3 Métodos diagnósticos da Síndrome Metabólica Equina.....	40
1.3.1 Exame físico .....	41
1.3.2 Exames laboratoriais.....	41
1.3.3. Diagnóstico diferencial .....	50
1.4 Considerações finais .....	54
1.5 Referências bibliográficas.....	54
CAPÍTULO 2 – Indicadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar em equinos Mangalarga Marchador induzidos à obesidade por dieta hipercalórica .....	69
Resumo .....	69

Abstract.....	69
2.1 Introdução .....	70
2.2 Material e métodos.....	71
2.3 Resultados.....	73
2.4 Discussão .....	74
2.5 Conclusão.....	76
2.6 Referências bibliográficas.....	77
CAPÍTULO 3 - Índices morfométricos e indicadores séricos, matemáticos e dinâmicos de desregulação insulínica em equinos com estresse oxidativo/nitrosativo lamelar pela indução experimental de obesidade.....	81
Resumo .....	81
Abstract.....	82
3.1 Introdução .....	83
3.2 Material e métodos.....	84
3.3 Resultados.....	87
3.4 Discussão .....	103
3.5 Conclusão.....	111
3.6 Referências Bibliográficas .....	112
CAPÍTULO 4 - Mensurações histológicas e radiográficas de cascos de equinos com estresse oxidativo/nitrosativo lamelar pela indução experimental de obesidade.....	122
Resumo .....	122
Abstract.....	122
4.1 Introdução .....	123
4.2 Material e métodos.....	123
4.3 Resultados.....	127

4.4 Discussão .....	141
4.5 Conclusão.....	144
4.6 Referências Bibliográficas .....	144
Considerações Gerais .....	148

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1. Valores de referência em quintiles para os proxies RISQI e MIRG para a espécie equina. Adaptado de Treiber *et al.* (2005).....44
- Tabela 3.1. Valores de r (Pearson ou Spearman) e p da correlação entre o IGF-1 sérico e as variáveis morfométricas e indicadores laboratoriais de desregulação insulínica de cavalos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses com estresse oxidativo/nitrosativo lamelar (NIT+) e sem estresse oxidativo/nitrosativo lamelar (NIT-). UBC: ultrassonografia da base da cauda; pescoço 25: circunferência do pescoço aos 25% do seu comprimento; AUCins: área sob a curva de insulina. .... 102
- Tabela 4.1. Médias e desvios padrão da ocorrência de diferentes formatos histológicos na região abaxial das LEP (lâminas epidermais primárias) de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a 5 meses de dieta hipercalórica e divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar) nos tempos antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Nas últimas 4 linhas estão presentes os valores de p nas comparações entre grupos e tempos respectivamente, com os valores menores que 0,05 destacados em negrito. .... 129
- Tabela 4.2. Médias e desvios padrão da ocorrência de diferentes formatos histológicos na região abaxial das LES (lâminas epidermais secundárias) de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a 5 meses de dieta hipercalórica e divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar) nos tempos antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Nas últimas 4 linhas estão presentes os valores de p nas comparações entre grupos e tempos respectivamente, com os valores menores que 0,05 destacados em negrito. .... 130
- Tabela 4.3. Médias e desvios padrão da ocorrência de diferentes formatos histológicos na região intermedia das LES (lâminas epidermais secundárias) de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a 5 meses de dieta hipercalórica e divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar) nos tempos antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Nas últimas 4

linhas estão presentes os valores de p nas comparações entre grupos e tempos respectivamente, com os valores menores que 0,05 destacados em negrito. .... 131

Tabela 4.4. Médias e desvios padrão da ocorrência de diferentes formatos histológicos na região axial das LES (lâminas epidermais secundárias) de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a 5 meses de dieta hipercalórica e divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar) nos tempos antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Nas últimas 4 linhas estão presentes os valores de p nas comparações entre grupos e tempos respectivamente, com os valores menores que 0,05 destacados em negrito. .... 132

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Fluxograma para o diagnóstico da desregulação insulínica, adaptado de Frank *et al.* (2020). DI: desregulação insulínica. RIA: radioimunoensaio. .... 42

Figura 1.2. Fluxograma para diagnóstico de DPIP em equinos. Adaptado de Toribio e Burns (2017). .... 52

Figura 2.1. Fotomicrografia do tecido lamelar de um equino Mangalarga Marchador que apresentando imunomarcagem para 3-nitrotirosina após serem submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses. A imagem da direita é parte da imagem da esquerda com maior magnificação, tal como indicado pela seta grande. Notam-se dois tipos de marcação, de forma difusa e em pontos espalhados, ambos na lâmina epidermal..... 74

Figura 3.1. Gráficos com médias e erro padrão de variáveis morfométricas de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Variáveis (de cima para baixo, da esquerda para a direita): peso, ultrassonografia da base da cauda (UBC), escore corporal e circunferências do pescoço nos locais correspondentes aos 25% (Pescoço 25), 50% (Pescoço 50) e 75% (Pescoço 75) do comprimento. A linha pontilhada horizontal no gráfico de escore corresponde ao escore

7, a partir do qual há maior risco de laminite endocrinopática (Durham, 2017). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ). ..... 88

Figura 3.2. Gráficos com médias e erro padrão do colesterol total e frações HDL, LDL e VLDL de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais nos gráficos se referem aos valores de referência do colesterol (Kaneko *et al.*, 1997) e frações (Yamamoto *et al.*, 1979). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ). ..... 90

Figura 3.3. Gráficos com médias e erro padrão dos triglicérides, ácidos graxos livres e frutossamina de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais nos gráficos se referem aos valores de referência de acordo com Kaneko *et al.* (1997). Não houve diferenças entre grupos ou tempos em nenhum destes analitos ( $p < 0,05$ ). 91

Figura 3.4. Gráficos com médias e erro padrão da glicemia e insulinemia em jejum de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais nos gráficos se referem aos valores de referência de glicose (Kaneko *et al.*, 1997) e limite de insulina a partir do qual há suspeita de desregulação insulínica (Frank *et al.*, 2020). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ). ..... 92

Figura 3.5. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis da razão glicose/insulina (G:I) de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais no gráfico se referem aos limites de de sensibilidade insulínica normal (acima de 10), resistência insulínica compensada (10 a 4,5) e resistência insulínica descompensada (abaixo de 4,5) (Frank, 2011). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ). ..... 93

Figura 3.6. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis do *proxie* RISQI de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais no gráfico se referem aos limites dos quintiles segundo Treiber *et al.* (2005). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ). ..... 94

Figura 3.7. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis do *proxie* MIRG de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais no gráfico se referem aos limites dos quintiles segundo Treiber *et al.* (2005). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ). ..... 95

Figura 3.8. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis do *proxie* HOMA-IR de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde

a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ )...... 96

Figura 3.9. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis do *proxie* QUICKI de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ )...... 97

Figura 3.10. Gráficos com médias e erro padrão das curvas de glicose resultantes do teste de baixa dose de glicose oral (TBDGO) de cavalos Mangalarga Marchador após 0 (junho), 90 (agosto) e 150 (novembro) dias de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos ( $p < 0,05$ ). ..... 98

Figura 3.11 Gráficos com médias e erro padrão das curvas de insulina resultantes do teste de baixa dose de glicose oral (TBDGO) de cavalos Mangalarga Marchador após 0 (junho), 90 (agosto) e 150 (novembro) dias de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. A linha pontilhada representa o limite máximo do pico de insulina em animais sem desregulação insulínica (Durham et al., 2019). Asteriscos sinalizam diferença entre os grupos NIT+ e NIT- pelo teste T, letras diferentes nas legendas mostram diferença entre as curvas pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos ( $p < 0,05$ )...... 99

Figura 3.12. Gráficos com médias e erro padrão das áreas sob a curva de glicose resultantes do teste de baixa dose de glicose oral (TBDGO) de cavalos Mangalarga Marchador após 0 (junho),

90 (agosto) e 150 (novembro) dias de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+) ( $p < 0,05$ ). ..... 100

Figura 3.13. Gráficos com médias e erro padrão das áreas sob a curva de insulina resultantes do teste de baixa dose de glicose oral (TBDGO) de cavalos Mangalarga Marchador após 0 (junho), 90 (agosto) e 150 (novembro) dias de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Asteriscos mostram diferença entre os grupos NIT+ e NIT- no referido mês pelo teste T, e letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+) ( $p < 0,05$ ). ..... 101

Figura 3.14. Gráficos com médias e erro padrão dos níveis séricos de IGF-1 livre de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais nos gráficos se referem aos valores de referência de IGF-1 existentes para pôneis (Köller *et al.*, 2016). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+) ( $p < 0,05$ ). ..... 102

Figura 4.1. Mensurações realizadas em cascos de membros torácicos os animais utilizados por meio do Software Metron Hoof Pro. 1: ângulo do casco, 2: ângulo palmar, 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: distância casco-falange proximal (CF proximal), 11: distância casco-falange distal (CF distal), 12: afundamento, 13: comprimento da falange média, 14: comprimento da quartela. Imagem adaptada de Drumond *et al.*, 2016..... 126

Figura 4.2. Gráfico com médias e erro-padrão do comprimento total das lâminas epidermais primárias (LEP) dos cascos de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses, divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar), antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Os símbolos \* representam diferença ( $p < 0,05$ ) pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT-, em junho e novembro. .... 128

Figura 4.3. Gráfico com médias e erro-padrão do comprimento da região intermédia da lâmina epidermal secundária (LES) dos cascos de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses, divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar), antes (junho) e após (novembro) o período experimental. O símbolo \* representa diferença ( $p < 0,05$ ) pelo teste T entre os meses de junho e novembro no grupo NIT+. .... 129

Figura 4.4. Gráficos com médias e erros padrão do suporte de casco do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica, divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+), e asteriscos sinalizam diferença pelo teste T entre os grupos NIT- e NIT+ no respectivo mês. Em todas as análises foi considerado significativo  $p < 0,05$ . .... 133

Figura 4.5. Gráficos com médias e erros padrão do ângulo da articulação interfalangeana do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica, divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Asteriscos sinalizam diferença pelo teste T entre os grupos NIT- e NIT+ no respectivo mês ( $p < 0,05$ ). .... 134

Figura 4.6. Gráficos com médias e erros padrão do ângulo de casco do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para

NIT+), e asteriscos sinalizam diferença pelo teste T entre os grupos NIT- e NIT+ no respectivo mês. Em todas as análises foi considerado significativo  $p < 0,05$ ..... 135

Figura 4.7. Gráficos com médias e erros padrão do ângulo de rotação do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ). ..... 135

Figura 4.8. Gráficos com médias e erros padrão da distância de break over do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ). ..... 136

Figura 4.9. Gráficos com médias e erros padrão da distância de afundamento do membro torácico esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ). ..... 137

Figura 4.10. Gráfico com médias e erros padrão do ângulo palmar do membro torácico esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ). ..... 138

Figura 4.11. Gráficos com médias e erros padrão das distâncias casco falange proximal e distal do membro torácico esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais)

estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ). ..... 139

Figura 4.12. Gráfico com médias e erros padrão do ângulo da articulação interfalangeana proximal do membro torácico esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ). ..... 140

Figura 4.13. Gráficos com médias e erros padrão da profundidade da sola do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ). ..... 141

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

$\beta$ END – peptídeos relacionados à  $\beta$ -endorfina

CF distal - distância entre as superfícies dorsal da falange distal e a parede do casco distal

CF proximal - distância entre as superfícies dorsal da falange distal e a parede do casco proximal

CGIT – teste combinado de glicose e insulina intravenosos

CLIP – peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotrofina

DI – desregulação insulínica

DP – desvio padrão

DPIP – disfunção da pars intermedia e pituitária

EHC – clamp euglicêmico hiperinsulinêmico

FSIGTT – teste de tolerância à glicose intravenosa com coleta frequente

G:I – razão glicose-insulina

GLUT – proteína transportadora de glicose

HOMA – modelo de avaliação de homeostase

HPA – eixo hipotálamo-pituitário-adrenal

IGF-1 – fator de crescimento similar à insulina

Interf. Dist. – ângulo da articulação interfalângica distal

Interf. Prox. – ângulo da articulação interfalângica proximal

JAK-STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição Janus quinase

LPH – hormônios  $\alpha$  e  $\beta$  lipotrofina

MIRG – razão insulina-glicose modificada

MSH – hormônio estimulador de melanócitos  $\alpha$  e  $\beta$

NIT – nitrotirosina

OGTT – teste de tolerância à glicose oral

OST – teste de açúcar oral

POMP – pro-opiomelanocortina

QUICKI – índice quantitativo de sensibilidade à insulina

RI – resistência à insulina

RNS – espécies reativas de nitrogênio

ROS – espécies reativas de oxigênio

SME – síndrome metabólica equina

SOD2 – superóxido dismutase

SOCS-3 – sinalizador de supressão da citocina-3

TBDGO – teste de baixa dose de glicose oral

TLR-4 – receptor tipo toll-like-4

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

UBC – ultrassonografia da base da cauda

## RESUMO

O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a geração e remoção de espécies reativas de oxigênio nos processos metabólicos no organismo, e sua ocorrência já foi documentada na laminite séptica. Objetivou-se neste trabalho avaliar o estresse oxidativo nas lâminas dos cascos e sua relação com alterações clínicas e laboratoriais observadas em cavalos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica. Foram utilizados material biológico e dados provenientes de experimento anterior, no qual 9 equinos da raça Mangalarga Marchador tiveram aumento de peso e adiposidade induzidos por 5 meses. Durante este período, foram realizadas medidas morfométricas corporais e ultrassonográficas de gordura subcutânea, coletas de sangue, teste dinâmico de baixa dose de glicose oral, biópsias e radiografias latero-mediais de cascos. O capítulo 1 consiste em uma breve revisão de literatura sobre as principais causas e métodos diagnósticos da síndrome metabólica equina (SME). O capítulo 2 descreve o estudo do estresse oxidativo nos cascos dos animais com imunomarcção dos metabólitos superóxido dismutase 2 (SOD2) e 3-nitrotirosina (NIT). Dos 9 animais, 4 tiveram marcação leve para 3-nitrotirosina na amostra obtida ao final do período experimental. Os achados são evidência inédita da ocorrência de estresse oxidativo lamelar em cavalos na ausência de laminite séptica. Os animais, então, foram divididos em dois grupos - NIT+ (com marcação para nitrotirosina) e NIT- (sem marcação para nitrotirosina) para as avaliações dos capítulos posteriores. No capítulo 3 estes grupos foram comparados quanto às medidas morfométricas corporais e analitos obtidos pelas coletas de sangue (lípidos, lipoproteínas, frutossamina, IGF-1, glicemia e insulinemia em jejum), e resultados dos testes dinâmicos de baixa dose de glicose oral. Neste capítulo também foram calculados os proxies G:I, MIRG, HOMA-IR, RISQI e QUICKI, e foi realizado teste de correlação do IGF-1 com as variáveis estudadas. Os animais do grupo NIT+ apresentaram menor altura de cernelha e desenvolveram de forma mais acentuada aumento de adiposidade, de indicadores de desregulação insulínica (DI) e de dislipidemia. Os resultados sugerem que o estresse oxidativo lamelar discriminou os animais mais susceptíveis a alterações metabólicas e morfométricas que poderiam culminar no desenvolvimento de SME. Os níveis de IGF-1 se correlacionaram com indicadores de DI e dislipidemia, corroborando com a hipótese de que este hormônio atua na SME. No capítulo 4 foram avaliados os parâmetros histológicos lamelares e os dados radiográficos de cascos dos grupos NIT+ e NIT-. Foram observadas mudanças na relação casco-falange e alterações no tamanho das lâminas epidérmicas mais acentuadas em NIT+. Desta forma, pode-se concluir que o estresse oxidativo lamelar destes animais decorre de maior propensão ao desenvolvimento de laminite endocrinopática por SME. Este estudo traz evidências pioneiras de que o estresse oxidativo lamelar, identificado pela marcação com 3-nitrotirosina, é fator importante no desenvolvimento de laminite endocrinopática em equinos com SME, havendo potencial de uso de seus marcadores na identificação de animais susceptíveis, mesmo antes da ocorrência de sinais clínicos.

Palavras-chave: laminite, nitrotirosina, obesidade, superóxido dismutase.

## ABSTRACT

Oxidative stress occurs when there is an imbalance between generation and removal of reactive oxygen species in metabolic processes, and its occurrence has already been documented in septic laminitis. The aim of this study was to evaluate oxidative stress on hoof blades and its relationship with clinical and laboratory alterations observed in Mangalarga Marchador horses submitted to a high calorie diet. Biological material and data from a previous experiment were used, in which 9 Mangalarga Marchador horses had an increase in weight and adiposity induced for 5 months. During this period, body morphometric and ultrasound measurements of subcutaneous fat, blood collections, dynamic low-dose oral glucose test, hooves biopsies and latero-medial radiographs were performed. Chapter 1 consists of a brief review of equine metabolic syndrome (EMS) causes and diagnostic methods. Chapter 2 describes the study of lamellar oxidative stress with immunostaining using superoxide dismutase 2 (SOD2) and 3-nitrotyrosine (NIT). Of the 9 animals, 4 had staining for 3-nitrotyrosine in the sample obtained at the end of the experimental period. The findings are unprecedented evidence for the occurrence of lamellar oxidative stress in horses in the absence of septic laminitis. The animals were then divided into two groups - NIT + (with nitrotyrosine staining) and NIT- (without nitrotyrosine staining) for the evaluations of the later chapters. In chapter 3, these groups were compared regarding body morphometric measurements and analytes obtained from blood collections (lipids, lipoproteins, fructosamine, IGF-1, fasting glucose and insulin), and results of dynamic low-dose oral glucose tests. In this chapter, proxies G: I, MIRG, HOMA-IR, RISQI and QUICKI were also calculated, and the IGF-1 correlation test was performed with the studied variables. The animals in the NIT + group showed lower height at the withers and developed a more pronounced increase in adiposity, indicators of insulin dysregulation (DI) and delipidemia. The results suggest that lamellar oxidative stress discriminated the animals most susceptible to metabolic and morphometric changes that could culminate in EMS development. IGF-1 levels correlated with insulin dysregulation and dyslipidemia indicators, corroborating the hypothesis that this hormone acts in EMS. In chapter 4, the lamellar histological parameters and radiographic data of hooves of the groups NIT + and NIT- were evaluated. Most pronounced changes in the hoof-phalanx relationship and in the epidermal lamina length in NIT + were observed. Thus, it can be concluded that the lamellar oxidative stress of these animals results from a greater propensity to the development of EMS associated laminitis. This study provides pioneering evidence that lamellar oxidative stress, identified by 3-nitrotyrosine labeling, is an important factor in the development of endocrinopathic laminitis in horses with EMS, and have potential to be a marker to identify susceptible animals, even before clinical signs presentation.

Keywords: laminitis, obesity, nitrotyrosine, superoxide dismutase.

## INTRODUÇÃO GERAL

Pesquisas médicas procuram identificar grupos e fatores de risco para doenças cardiovasculares, por exemplo, a fim de estabelecer diagnósticos precoces e formas de prevenção efetivas. No caso dos cavalos, a prevenção e a busca por indícios precoces da susceptibilidade dos animais à laminite endocrinopática por síndrome metabólica equina (SME) vão do estudo de marcadores genéticos (Lewis *et al.*; 2017) a classificações morfométricas de pescoço (Walsh *et al.*; 2009).

O projeto do qual deriva este estudo, avaliou mudanças conformacionais, metabólicas, radiográficas e histológicas em 9 equinos sadios da raça Mangalarga Marchador submetidos a uma dieta hipercalórica durante 150 dias. Este projeto, conduzido pelo agora doutor Rodrigo Ribeiro, orientado pelo professor Rafael Faleiros, contou com a participação extensiva do grupo de pesquisa EQUINOVA e resultou em novas informações acerca das adaptações que o metabolismo sofre ao submetemos os animais ao excesso de energia na forma de carboidratos solúveis. Alterações em indicadores de desregulação insulínica, em medidas radiográficas e na histologia lamelar foram encontradas, mostrando que a dieta causou desequilíbrios compatíveis com o desenvolvimento da SME (Ribeiro, 2017).

Por meio de uma parceria com a pesquisadora Luciane Lakoski, obtivemos os resultados dos marcadores de estresse oxidativo superóxido dismutase (SOD) e 3-nitrotirosina (NIT) nas lâminas dos cascos dos animais, avaliadas por meio de biópsia antes e após o período experimental (capítulo 2). A atuação de radicais livres está relacionada a diversas enfermidades e condições de risco em equinos e humanos, incluindo obesidade (Pleasant *et al.*, 2013; Salinas *et al.*, 2020), diabetes e doenças cardiovasculares (Frustaci *et al.*, 2000; Calder *et al.*, 2011), colite (Keshavarzian *et al.*, 2003; Karp e Koch, 2006; Laskoski *et al.*, 2016), envelhecimento precoce (Grun *et al.*, 2018) e laminite séptica (Yin *et al.*, 2009). Por meio dos resultados das imunomarcações, pudemos estudar as diferentes respostas dos animais frente ao desafio da dieta. Separamos os animais em grupos, de acordo com o perfil oxidativo/nitrosativo observado, e pudemos distinguir animais com diferentes níveis de alterações morfológicas e metabólicas (capítulo 3) e mudanças histológicas e radiográficas nos cascos (capítulo 4).

## Hipótese

Em uma amostra populacional de equinos Mangalarga Marchador induzidos à obesidade com dieta rica em carboidratos não estruturais, existem animais que desenvolvem estresse oxidativo/nitrosativo lamelar e se diferenciam dos demais por apresentarem alterações mais intensas em biomarcadores de síndrome metabólica e consequente laminite endocrinopática, considerando-se variáveis clínicas, laboratoriais, radiográficas e histopatológicas do casco.

## Objetivo geral

Avaliar indicadores clínicos, laboratoriais, radiográficos e histológicos de síndrome metabólica equina e laminite endocrinopática em equinos com ou sem marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar.

## Objetivos específicos

Avaliar o estresse oxidativo/nitrosativo das lâminas dos cascos de cavalos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica.

Relacionar a ocorrência de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar a alterações de peso, escore corporal, adiposidade e morfometria de pescoço em equinos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica.

Relacionar a ocorrência de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar a alterações de lípidos, lipoproteínas, hormônio IGF-1 e frutossamina em equinos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica.

Relacionar a ocorrência de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar a alterações em indicadores de desregulação insulínica – glicemia e insulinemia em jejum, proxies, resultados do teste dinâmico de baixa dose de glicose oral (TBDGO) - em equinos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica.

Verificar correlação entre os níveis séricos de IGF-1 e indicadores clínicos e laboratoriais de síndrome metabólica equina em cavalos Mangalarga Marchador com e sem estresse oxidativo/nitrosativo lamelar após serem submetidos à dieta hipercalórica.

Relacionar a ocorrência de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar e alterações radiográficas de cascos em equinos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica.

Relacionar a ocorrência de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar e alterações histológicas nas lâminas do casco em equinos Mangalarga Marchador antes e após serem submetidos a dieta hipercalórica.

### Referências bibliográficas

CALDER, P. C., AHLUWALIA, N., BROUNS, F., *et al.* Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br. J. Nutr.*, 106(S3), S1-S78, 2011.

FRUSTACI, A., KAJSTURA, J., CHIMENTI, C., *et al.* Myocardial cell death in human diabetes. *Circ. Res.*, v. 87, n. 12, p. 1123-1132, 2000.

GRUN, L. K., TEIXEIRA JR, N. R., VON MENGDEN, L., *et al.* TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 129, p. 286-295, 2018.

KARP, S. M., KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Dis. Mon.*, v. 5, n. 52, p. 199-207, 2006.

KESHAVARZIAN, A., BANAN, A., FARHADI, A., *et al.* Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, v.52, n. 5, p.720-728, 2003.

LASKOSKI, L. M., LOCATELLI-DITTRICH, R., SOUSA, R. S., *et al.* Lamellar lesions in horses with systemic oxidative stress, committed by experimentally induced or naturally occurring gastrointestinal disorders. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 36, n. 8, p. 694-700, 2016.

LEWIS, S. L., HOLL, H. M., STREETER, C., *et al.* A. Genomewide association study reveals a risk locus for equine metabolic syndrome in the Arabian horse. *J. Anim. Sci.*, v.95, n.3, p.1071-1079, 2017.

MCCUE, M. E., GEOR, R. J., SCHULTZ, N. Equine metabolic syndrome: a complex disease influenced by genetics and the environment. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 35, n. 5, p.367-375, 2015.

PLEASANT, R. S., SUAGEE, J. K., THATCHER, C. D., *et al.* Adiposity, plasma insulin, leptin, lipids, and oxidative stress in mature light breed horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v.27, n. 3, p. 576-582, 2013.

RIBEIRO, R. M. Relação entre obesidade induzida e laminite endocrinopática em equinos Mangalarga Marchador: aspectos clínicos, laboratoriais, morfométricos e patológicos. 2017.

153 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SALINAS, C., ESPINOSA, G., MORALES, N., *et al.* Assessment of peripheral blood neutrophil respiratory burst, phagocytosis and apoptosis in obese non-insulin dysregulated horses. *Res. Vet. Sci.*, v. 132, p.127-132, 2020.

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.

YIN, C., PETTIGREW, A., LOFTUS, J. P., *et al.* Tissue concentrations of 4-HNE in the black walnut extract model of laminitis: indication of oxidant stress in affected laminae. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 129, n. 3-4, p. 211-215, 2009.

## **CAPÍTULO 1 – Causas e métodos diagnósticos da síndrome metabólica equina (SME) - revisão de literatura**

### **1.1 Introdução**

A síndrome metabólica equina (SME) é definida pelo Consenso do Colégio Europeu de Medicina Interna Equina (ECEIM) como uma síndrome caracterizada pelo aumento do risco de desenvolvimento de laminite endocrinopática, desregulação insulínica e obesidade/adiposidade regional que pode ou não estar presente (Frank *et al.*, 2010; Durham *et al.*, 2019). Antes, pelo Consenso do Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna (ACVIM) de 2010, a obesidade era considerada um fator essencial e, a hiperinsulinemia observada na SME, estritamente resultado do desenvolvimento de resistência à insulina (RI) pelos animais (Frank *et al.*, 2010), a qual é definida como habilidade reduzida de dada quantidade de insulina reduzir a glicemia (McCue *et al.*, 2015). Estudos ocorridos neste ínterim revelaram a interferência do eixo enteroinsular (de Laat *et al.*, 2016), que causa um aumento da resposta secretória de insulina por meio de hormônios – incretinas – liberados no trato gastrointestinal estimulado pela presença de alimento, tornando o termo desregulação insulínica (DI) mais apropriado (Durham *et al.*, 2019).

Para a averiguação da SME, é necessário um exame físico, exames laboratoriais que comprovem o estado de DI, e exames complementares para a identificação de complicações concomitantes, como radiografia dos cascos para identificação de alterações podofalângicas sugestivas de laminite (Durham, 2017a). É importante destacar que existem vieses relatados na literatura, como, por exemplo, o fato de alguns animais sem obesidade ou adiposidade regional apresentarem DI e predisposição a laminite (Bailey *et al.*, 2008), e que há insuficiência de informações sobre as diferenças existentes entre raças quanto à sensibilidade à insulina e respostas insulínicas aos testes laboratoriais (Bamford *et al.*, 2014), e sobre os valores de referência de insulina mensurada em alguns equipamentos (Frank *et al.*, 2010). Portanto, o estudo da SME ainda apresenta muitos questionamentos a serem elucidados, como o próprio Consenso do ACVIM menciona ao salientar que o termo “síndrome metabólica equina” foi proposto a primeira vez apenas em 2002 (Johnson, 2002; Frank *et al.*, 2010).

### **1.2 Causas da Síndrome Metabólica Equina**

### 1.2.1 Causas endócrinas

#### **Insulina**

Não há consenso quanto ao papel da insulina no desenvolvimento da resistência à insulina. A hiperinsulinemia é considerada uma resposta compensatória em humanos diabéticos, no entanto, há evidências de que a hiperinsulinemia provoca DI, levantando a dúvida se a hiperinsulinemia seria a causa ou consequência da DI, ou ambos (Shanik *et al.*, 2008). Dietas altamente ricas em carboidratos não estruturais (açúcares simples e facilmente digeríveis, como glicose, sacarose e amido) causam elevação dos níveis glicêmicos e uma resposta pancreática de secreção insulínica exacerbada, que pode levar ao desenvolvimento de laminite e resistência insulínica (Marycz *et al.*, 2018). Por isso, no manejo de animais com síndrome metabólica, atualmente considera-se também o índice glicêmico dos alimentos para a elaboração da dieta, tal como na medicina humana (Burns e Toribio, 2017).

A hiperinsulinemia ocorre na DI tanto pela resposta pancreática compensatória quanto pela redução do *clearance* da insulina pelo fígado. Estudos médicos com pacientes obesas (Jones *et al.*, 2000), cães (Kim *et al.*, 2007) e um estudo em equinos (Tóth *et al.*, 2010) observaram esta redução do *clearance*, o que por consequência poupa as células beta-pancreáticas da fabricação de maiores quantidades insulina (McCue *et al.*, 2015).

As incretinas, hormônios produzidos no intestino em resposta à presença de nutrientes, também são responsáveis por estimular a secreção de insulina na DI (McCue *et al.*, 2015). Dentre eles, os mais estudados são o peptídeo-1 similar ao glucagon (GLP-1) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). Os receptores para GLP-1 estão presentes em diversos tecidos nos equinos, inclusive nas ilhas beta-pancreáticas, onde causam secreção de insulina de forma concentração-dependente de GLP-1 (Kheder *et al.*, 2018). O GIP tem sua liberação relacionada à presença de glicose no intestino e também contribui aditivamente no estímulo à secreção de insulina, porém de forma menos intensa que o GLP-1 e a glicose nos equinos (de Laat *et al.*, 2016). Schultz *et al.* (2014) mostraram alterações nos níveis de insulina, glicose e GLP-1 após teste de tolerância à glicose oral sugestivas de resposta às incretinas em equinos com diferentes

dietas, portanto a relação causal entre hiperinsulinemia e incretinas pode ser considerada e precisa de estudos mais aprofundados (McCue *et al.*, 2015).

### **Insulina e laminite**

Acreditava-se que a causa da separação das células lamelares epiteliais basais da membrana basal na laminite endocrinopática seria a privação de glicose (Pass *et al.*, 1998). Sabe-se que no casco não há GLUT-4 (transportador de glicose responsivo a insulina) ou receptores de insulina, sendo o GLUT-1 (não responsivo ou dependente de insulina) o mais provável responsável pelo transporte de glicose no casco sadio (Johnson, 2017a). Ao contrário do que se observa na musculatura e no fígado, Burns *et al.* (2014) mostraram que as lâminas do casco equino não sofrem privação de energia causada por falha no transporte de glicose ou por isquemia durante a laminite endocrinopática, sugerindo como causas fatores relacionados a efeitos locais da hiperinsulinemia ou fluxo aumentado de glicose.

O mecanismo de desenvolvimento da laminite endocrinopática provavelmente está relacionado à superestimulação de receptores do fator de crescimento IGF-1 pela insulina em excesso circulante e redução da concentração de AMP-proteína quinase ativada (AMPK) nas células lamelares, o que causaria desregulação do controle do citoesqueleto, falha na aderência celular e redução do metabolismo energético celular, respectivamente (Burns e Toribio, 2017, Durham *et al.*, 2019). Receptores de GLP-1 causam estímulo à proliferação celular de forma similar ao IGF-1 e estão presentes, dentre outros locais, nas lâminas digitais dos equinos, portanto existe a possibilidade do envolvimento desta incretina no desenvolvimento da laminite endocrinopática (Kheder *et al.*, 2018).

Apesar de estudo recente *in vitro* utilizando receptores e ligantes heterólogos ter relatado que nas lâminas a insulina possui 5800 vezes menor afinidade com receptores de IGF-1 do que o próprio IGF-1 (Nanayakkara *et al.*, 2019), gerando dúvidas quanto à hipótese de que a laminite é causada pela ligação da insulina a estes receptores, diversos outros corroboram com a hipótese. Estudos demonstraram que células epiteliais lamelares proliferaram em cultivo celular (Bailey e Chockalingham, 2010) e em explantes lamelares frescos (Rahnama *et al.*, 2020) ao serem incubadas com insulina e não

proliferaram ao serem co-incubadas com um antagonista de IGF-1, e De Laat *et al.* (2013) mostraram que equinos submetidos ao clamp euglicêmico hiperinsulinêmico tiveram menor expressão de receptores de IGF-1 no tecido lamelar, condizente com inibição causada pela estimulação excessiva pela insulina. Outra ação relevante da insulina é sua capacidade de aumentar a concentração plasmática de endotelina-1, que causa vasoconstrição e participa da patofisiologia da laminite (Juan *et al.*, 2004, Maricz *et al.*, 2018).

Walsh *et al.* (2009) observaram que animais com laminite endocrinopática, por doença de Cushing ou síndrome metabólica, tinham níveis de insulina plasmática mais altos que animais sem laminite, vivendo sob as mesmas condições, com correlação positiva entre o grau Obel de claudicação e concentração de insulina. Porém, mesmo havendo correlação positiva entre concentração plasmática de insulina e gravidade da laminite no estudo, não foi observada redução dos níveis de insulina em animais tratados com dieta e exercícios para regressão da síndrome metabólica, apesar do tratamento resultar em melhora do quadro de laminite.

### **Tecido adiposo, obesidade e resistência à insulina**

O tecido adiposo branco é um órgão de armazenamento cujo tamanho sofre flutuações de acordo com o balanço energético dos mamíferos (McTernan *et al.*, 2005) e também atua como uma glândula endócrina, secretando hormônios, como a leptina e adiponectina, e citocinas inflamatórias, como a interleucina-6, fator de necrose tumoral alfa e a p53, responsável pela sinalização pró-inflamatória (Steppan and Lazar, 2002, McTernan *et al.*, 2005, Minamino *et al.*, 2009 Burns e Toribio, 2017; Marycz *et al.* 2018). Dessa forma o tecido adiposo interfere na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios, e na inflamação do organismo.

Outro papel importante do tecido adiposo, reconhecido pela medicina humana, é a função de livrar os tecidos do excesso de ácidos graxos livres ao estocá-los (Burns e Toribio, 2017). A importância da função de estocagem e função secretiva de hormônios pelo tecido adiposo pode ser observada em pessoas com lipodistrofia, que apresentam hipertrigliceridemia, metabolismo da glicose desordenado e resistência à insulina (Petersen *et al.*, 2002).

A gordura acumulada em certos locais é endocrinologicamente mais ativa do que em outros, o que resulta, em humanos, no conceito de que o acúmulo de gordura abdominal sinaliza maior risco de doenças cardiovasculares (Després e Lemieux, 2006; Burns e Toribio, 2017). Da mesma forma, observa-se que nos equinos os tecidos adiposos acumulados no omento e vísceras (Waller *et al.*, 2011, Burns e Toribio, 2017) e o acumulado no tecido subcutâneo dorsal (crista) do pescoço (Carter *et al.*, 2009a; Walsh *et al.*, 2009; Burns e Toribio, 2017) apresentam maior relação com desregulação insulínica e, conseqüentemente, representam maior risco de ocorrência de doenças associadas, como a laminite. A presença de maior estresse oxidativo decorrente da obesidade em pessoas (De Marchi *et al.*, 2013; Marycz *et al.*, 2018) e em cavalos (Pleasant *et al.*, 2013; Salinas *et al.*, 2020) foi reportada em diversos estudos. E seres humanos, independentemente de sofrerem de comorbidades, têm redução de telômeros pela ação das espécies reativas de oxigênio, o que ocasionaria envelhecimento precoce (Grun *et al.*, 2018).

Enquanto em mulheres é descrito que, apesar da maior adiposidade, apresentam maior sensibilidade à insulina que os homens, provavelmente pelo fator protetor conferido pelos estrógenos e menor acúmulo de gordura visceral e hepática (Geer e Shen, 2009; Burns e Toribio *et al.*, 2017), nos equinos não há relatos de diferença de fatores de risco entre sexos (Burns e Toribio, 2017).

Em humanos, sabe-se que o tecido adiposo visceral é mais responsivo às catecolaminas que à insulina. Portanto, a lipólise predomina sobre a lipogênese neste tecido, liberando ácidos graxos não esterificados, implicados também no desenvolvimento da resistência à insulina (McTernan, 2005). Em equinos, o estudo de Waller *et al.* (2012) mostrou que o tecido adiposo visceral de animais insulino-resistentes estava mais metabolicamente ativo que o tecido adiposo subcutâneo. Houve maior presença de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), um potente liberador de ácidos graxos livres, os quais ativam receptores toll-like-4, apontados em alguns estudos como responsáveis pelo desenvolvimento de resistência à insulina (Saber *et al.*, 2009; Waller, 2012).

Sabe-se que alguns sinalizadores indicam alteração intensa do metabolismo da gordura. Camundongos experimentalmente deficientes de TLR-4 não desenvolvem resistência à

insulina induzida por dieta rica em gorduras, mesmo quando se tornam obesos (Saber *et al.*, 2009). Em equinos insulino-resistentes apresentam maior expressão deste receptor e de SOCS-3 (sinalizador de supressão de citocina-3) na gordura visceral e na musculatura esquelética, mas não na gordura subcutânea, sugerindo que a ativação de TLR-4 via SOCS-3 pode ser a causa da resistência à insulina e reforçando a atuação pró-inflamatória principalmente do tecido adiposo visceral (Waller *et al.*, 2012).

### **Adipocinas e citocinas**

Existem evidências de estreita correlação entre a adiposidade regional, RI e consequente risco de desenvolvimento de laminite endocrinopática (Walsh *et al.*, 2009), correlação entre obesidade, citocinas inflamatórias e RI (Vick *et al.*, 2007), e aumento da adiposidade pela superalimentação causando RI (Carter *et al.*, 2009b) ou desregulação insulínica em equinos (Mello, 2016, Ribeiro, 2017). Sabe-se que os adipócitos sofrem hipóxia e necrose quando estocam excesso de triglicérides, causando infiltração de leucócitos, fato que está correlacionado diretamente à RI (Burns e Toribio, 2017). O estado de inflamação crônica causado pela obesidade é agravado pela produção e liberação de citocinas pelos próprios adipócitos (Radin *et al.*, 2009). No entanto, como não necessariamente um indivíduo obeso tem sua sensibilidade à insulina prejudicada, é necessária a mensuração de metabólitos ativos que representem a atuação endócrina real do tecido adiposo, como adiponectina, resistina e leptina (Petersen e Schulman, 2006; Burns e Toribio, 2017).

A leptina é um agente humoral produzido pelos adipócitos que atua no hipotálamo, tendo como efeito a redução no consumo alimentar (Engelking, 2010), e o aumento da taxa metabólica especialmente após o consumo de gorduras, sinalizando a saciedade e estimulando a perda de peso (Norris e Carr, 2013).

A leptina atua no sistema nervoso central por meio da via JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) ligando-se a receptores ObRb, os quais causam um feedback negativo em si próprios após desencadearem vias que resultam na expressão genética de proteínas como a SOCS-3 (sinalizador de supressão de citocina-3) (Norris e Carr, 2013). Isso explica o fato das concentrações de leptina apresentarem-se muito aumentadas em animais e seres humanos obesos, provavelmente pela

resistência dos seus receptores constantemente estimulados (Engelking, 2010). Em equinos a concentração de leptina plasmática é diretamente proporcional à adiposidade (Kearns *et al.*, 2006), reforçando as evidências de que estes animais desenvolvem um estado de resistência à leptina. O SOCS-3 é um sinalizador pró-inflamatório, e já foi relacionado à resistência à insulina em equinos, juntamente com o fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) (Waller *et al.*, 2012).

Waller *et al.* (2011) encontraram reduzida expressão da proteína transportadora GLUT-4 (proteína transportadora de glicose-4) na superfície de células musculares de éguas insulino-resistentes, demonstrando uma redução da capacidade de transporte de glicose neste tecido em animais com SME. E em estudo posterior foi publicada a correlação negativa entre SOCS-3 e GLUT-4 no músculo esquelético destes animais, sugerindo relação entre inflamação e impedimento no transporte de glicose nos estágios iniciais da resistência à insulina (Waller *et al.*, 2012).

A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina, provavelmente pelo estímulo à oxidação de ácidos graxos nos tecidos, reduzindo os níveis de ácidos graxos circulantes e aqueles presentes nos miócitos e no fígado (Havel, 2002). A adiponectina tem sua expressão mRNA inibida pelo TNF- $\alpha$ , dexametasona e pela hiperinsulinemia (Fasshauer *et al.*, 2002; Kearns *et al.*, 2006), o que poderia explicar a concentração de adiponectina inversamente proporcional à adiposidade observada em equinos (Kearns *et al.*, 2006). Sabe-se que por meio da utilização de agonistas do receptor gama ativado por proliferador do peroxissoma (PPAR), como as tiazolidinedionas, aumenta-se a produção de adiponectina, contribuindo com a sensibilização dos tecidos à insulina, sendo esta classe de medicamentos utilizada no tratamento do diabetes tipo 2 em humanos (Havel, 2002).

### **Corticosteroides**

A administração de corticosteroides pode causar ou piorar a desregulação insulínica nos equinos e sua administração pode resultar em laminite em determinados animais (Johnson, 2017a). Welsh *et al.* (2017), ao analisar 26 anos de fichas de atendimentos de várias clínicas veterinárias do Reino Unido, observaram que os corticosteroides não eram um fator de risco relevante para o primeiro episódio de laminite, mas que a

administração de prednisolona aumentou em mais de cinco vezes o risco de desenvolvimento da laminite em animais que já haviam apresentado a enfermidade anteriormente. Outro estudo inglês apontou maior risco de laminite após administração de corticosteroides em pôneis, animais obesos ou com sobrepeso e animais com histórico de laminite ou doenças endocrinopáticas (Potter *et al.*, 2019).

Corticoides endógenos ou exógenos são potentes inibidores da ação da insulina: estimulam a gliconeogênese hepática, provocam hiperinsulinemia, reduzem a atividade da glicogênio-sintase-estimulada-pela-insulina e com isso reduzem a sensibilidade à insulina (Tiley *et al.*, 2007 citado por Johnson, 2017a). Walsh *et al.* (2009) relataram correlação positiva entre a severidade da laminite (graduação Obel) e os valores de insulina basal de animais com disfunção da pars intermedia e pituitária (DPIP) e SME, sugerindo relação da laminite endocrinopática por DPIP com desregulação insulínica, ou seja, o aumento da cortisolemia por estímulo excessivo do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal reduzindo a sensibilidade à insulina.

Outras possíveis consequências que podem ser imputadas aos corticosteroides, sugeridas por estudos em outras espécies, são a fragilização das lâminas, redução da força de adesão dermo-epidermal do casco pela supressão da via canônica sinalizadora-Wnt, impedimento da utilização da glicose por meio da ação sobre os transportadores GLUT, aumento da resposta hiperinsulinêmica pós-prandial pelo aumento de incretinas, aumento do estresse oxidativo e produção de radicais livres (Johnson, 2017a).

### **Endocrinologia e sazonalidade**

Os equinos, como a maioria dos herbívoros, na natureza aumentam a ingestão de alimentos e acumulam gordura corporal durante o outono para passarem bem o inverno, e, durante este período, ficam em um estado transitório e moderado de metabolismo pró inflamatório e resistência à insulina (Johnson *et al.*, 2006).

Foi observado por Bailey *et al.* (2008) que pôneis não obesos predispostos a laminite apresentavam redução da sensibilidade à insulina durante o verão, apesar da redução de escore corporal ocorrida durante esta estação. O mesmo não foi observado por Place *et al.*, (2010) que reportaram ausência de padrão sazonal da insulina, tiroxina e cortisol em

cavalos sadios e com síndrome metabólica. No entanto, a falta de homogeneidade dos grupos quanto a raças pode ter sido um limitante do estudo.

No outono, níveis de ACTH aumentados e positividade ao teste de supressão à dexametasona podem ocorrer em animais sadios, sem DPIP, o que pode ser confirmado ao se realizar os testes durante o verão (Bailey *et al.*, 2008). O ACTH apresenta variação sazonal, onde os valores mais elevados ocorrem no final do verão e outono (Place *et al.*, 2010).

## 1.2.2 Causas metabólicas

### **Dietas hipercalóricas e obesidade**

A SME costuma desenvolver-se em animais alimentados em excesso tanto no tocante de proporção de carboidratos não estruturais como também quantidade de energia (Marycz *et al.*, 2018). No entanto, Hoffman *et al.* (2003) mostraram que animais não obesos submetidos a dieta rica em açúcar e amido tiveram sua sensibilidade à insulina reduzida comparada à dieta rica em fibras e gorduras. Vick *et al.* (2007) mostraram que existe correlação entre obesidade, citocinas inflamatórias e resistência à insulina em equinos e Walsh *et al.* (2009) relataram que o escore de pescoço igual ou maior que 3 pode ser considerado um indicador fenotípico de resistência à insulina e tendência à laminite endocrinopática. A obesidade pode ou não ser fator fenotípico indispensável para a síndrome metabólica equina (Bamford *et al.*, 2014). Existem evidências de que apenas a indução da obesidade em dietas ricas em lipídeos não causa redução da sensibilidade à insulina (Bamford *et al.*, 2016). Contudo, independente do escore corporal, estudos mostram que dietas ricas em carboidratos solúveis reduzem a sensibilidade à insulina (Burns e Toribio, 2017) em equinos adultos (Williams *et al.*, 2001, Ribeiro 2017), potros desmamados (Treiber *et al.*, 2005) e mesmo em potros não desmamados cujas mães foram submetidas a dieta rica em amido no último trimestre de gestação (George *et al.*, 2009). Estes achados sugerem, portanto, que, apesar da existência de indivíduos mais suscetíveis à síndrome metabólica, a obesidade por si só causaria desregulação insulínica.

### **SME e estresse oxidativo**

O termo “radicais livres” abarca vários grupos de moléculas, os quais são classificados de acordo com o átomo reativo: espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) ou espécies reativas de enxofre (Sies e Jones, 2020). O metabolismo oxidativo, inerente à vida aeróbica, demanda a formação destes radicais, os quais funcionam como sinalizadores e reguladores dos sistemas imune cardiovascular e nervoso (Bartesaghi e Radi, 2018; Sies e Jones, 2020). No entanto, o excesso de produção de oxidantes e/ou depleção dos mecanismos de remoção dos mesmos (agentes redutores ou antioxidantes) é prejudicial, e está associada a situações como inflamação, morte celular, crescimento de tumores e metástases (Sies e Jones, 2020).

A obesidade é causa e consequência de diversas alterações metabólicas, e resulta em alterações endocrinológicas importantes. O aumento do estresse oxidativo causado pela obesidade excede a capacidade anti-oxidante do organismo, o DNA é danificado, aumenta a expressão de p53 no tecido adiposo, e com isso há maior expressão genética e liberação de citocinas inflamatórias, culminando em maior risco de doenças metabólicas (Furukawa *et al.*, 2004; Minamino *et al.*, 2009; Marycz *et al.*, 2018). Fatores nutricionais também podem estar envolvidos no desequilíbrio entre a produção de estresse oxidativo e resposta antioxidante. A deficiência de riboflavina, por exemplo, causa aumento de radicais livres, ativa macrófagos no tecido adiposo e induz um estado pró-inflamatório e insulino-resistente nos adipócitos (Mazur-Bialy and Pocheć, 2016; Mazur-Bialy and Pocheć, 2017; Marycz *et al.*, 2018), o que reforça a interferência de fatores ambientais, especialmente a alimentação, no desenvolvimento de síndrome metabólica.

### **1.2.3 Causas genéticas**

#### **Evolução e raças predispostas**

Na natureza, o acúmulo de energia é vantajoso, especialmente quando se considera que períodos de escassez colocam em risco a saúde dos animais. Cavalos com facilidade em adquirir maiores escores corporais mesmo se alimentando de pasto e sendo pouco ou nada suplementados são chamados de "easy keepers", apresentam SME e os mesmos genes que conferem a característica corporal e a síndrome podem ser considerados um

avanço evolutivo, que aumenta as chances de sobrevivência em períodos de escassez (Lewis *et al.*, 2017).

Apesar da atuação endócrina no tecido adiposo ser inegável, a relação entre obesidade e resistência à insulina em equinos não se dá de forma absoluta, observando-se indivíduos obesos com sensibilidade à insulina satisfatória e indivíduos de escore corporal moderado insulino-resistentes (Bailey *et al.*, 2008; Burns e Toribio, 2017). Por outro lado, é relatada na literatura a predisposição de certas raças ao desenvolvimento da resistência à insulina e laminite endocrinopática: pôneis (Treiber *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2008), Mangalarga Marchador (Magalhães *et al.*, 2014; Ribeiro, 2017), Campolina (Magalhães *et al.*, 2017), Crioulo (Paz *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013), por exemplo.

### **Fatores genéticos**

Treiber *et al.* (2006) estudaram a herdabilidade da laminite associada ao pastejo em pôneis e concluíram que a mesma está associada a genes dominantes ou com baixa penetrância. McCue *et al.* (2015), posteriormente, avaliaram que o risco de desenvolvimento de SME está ligado a diferentes alelos de diversos *loci* genéticos e a interação entre estes alelos (que podem conferir fatores de proteção ou fatores de risco ao indivíduo), e aos fatores ambientais e a sua interação (como dieta e exercícios). No estudo citado (McCue *et al.*, 2015), foi proposto um modelo hipotético de risco genético ligado a raças, onde diferentes raças possuem ou não certos alelos que representam risco de desenvolvimento de SME, porém com ocorrência mais ou menos frequente, justificando a diferença dos fenótipos e ocorrência de SME entre raças diferentes, tal como ocorre em seres humanos de diferentes grupos étnicos e diferentes incidências de síndrome metabólica.

Lewis *et al.* (2017), ao avaliar o genoma de duas populações de cavalos árabes, observaram que o alelo dominante *FAM174A 11"G* confere maior risco de laminite e aumento da insulina circulante, sugerindo de forma inédita na espécie equina um haplótipo indicador de risco para SME.

## **1.3 Métodos diagnósticos da Síndrome Metabólica Equina**

### 1.3.1 Exame físico

Como mencionado anteriormente, raça, adiposidade regional, histórico de laminite anterior, dieta rica em carboidratos e facilidade em ganhar peso são indicativos de maior risco de desenvolvimento da síndrome metabólica. Portanto, a observação do histórico e o exame físico detalhado do animal são o primeiro requisito para orientar o diagnóstico da SME. Outros achados clínicos, como hipertensão e disfunção reprodutiva, apesar de menos comuns, podem ser considerados consequência da síndrome (Bailey, 2008; Frank, 2009; Durham, 2017a). Nas fêmeas o estado de prenhez deve ser considerado, visto que existe um estado transitório de desregulação insulínica no qual há menor sensibilidade periférica, maior secreção e reduzido *clearance* de insulina (George *et al.*, 2011; Frank e Tadros, 2013).

### 1.3.2 Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais são importantes para acusar a desregulação insulínica, principal fator envolvido no desenvolvimento da SME (Frank *et al.*, 2010; Durham *et al.*, 2019).

Os testes simples ou de triagem consistem em coletas de sangue únicas, feitas quando o cavalo está de 3 a 6 horas sem comer ração ou alimentos ricos em carboidratos solúveis, e que fornecem dados de momento particular do estado endocrinológico do animal e são úteis para o acompanhamento do tratamento, avaliação do risco de laminite e progressão da doença (Toribio e Burns, 2017; Frank *et al.*, 2020).

Os testes dinâmicos avaliam como o sistema endócrino reage à glicose ou insulina, dão informação acerca da cinética da glicose e insulina, têm valor diagnóstico e prognóstico, dão informação acurada da progressão da doença e risco de laminite (Toribio e Burns, 2017).

Os testes considerados padrão ouro para diagnóstico de resistência à insulina são os testes dinâmicos de resposta glicêmica e insulinêmica à insulina e/ou glicose (clamp euglicêmico hiperinsulinêmico – EHC, e teste de tolerância à glicose intravenosa com coleta frequente – FSIGTT), os quais foram desenvolvidos na medicina humana e validados para a espécie equina (Pratt *et al.*, 2005). No entanto estes testes não são considerados factíveis na prática clínica, pela complexidade (McCue *et al.*, 2015), custo e risco para os animais (Marycz *et al.*, 2018), não sendo aprovado, inclusive, por alguns comitês de ética de uso animal (Bailey *et al.*, 2008). Os testes de insulinemia e glicemia em repouso são mais práticos, porém são considerados

pouco confiáveis (McCue *et al.*, 2015; Frank *et al.*, 2020) e podem sofrer interferência de diversos fatores, inclusive da dor decorrente da laminite endocrinopática que os animais com SME podem apresentar (Frank *et al.*, 2010). Outros testes dinâmicos, como o teste da tolerância à glicose oral, são mais simples e factíveis, e apresentam boa correlação com os testes padrão ouro (Phillip-Pratt *et al.*, 2015). De qualquer forma, a recomendação atual é conhecer os princípios fisiológicos do teste escolhido para saber interpretar seu valor diagnóstico na desregulação insulínica (Durham *et al.*, 2019).

O grupo de pesquisa *Equine Endocrinology Group*, sugere em seu manual (Frank *et al.*, 2020) uma organização sistemática dos testes para o diagnóstico desregulação insulínica, que está presente na figura 1.1.

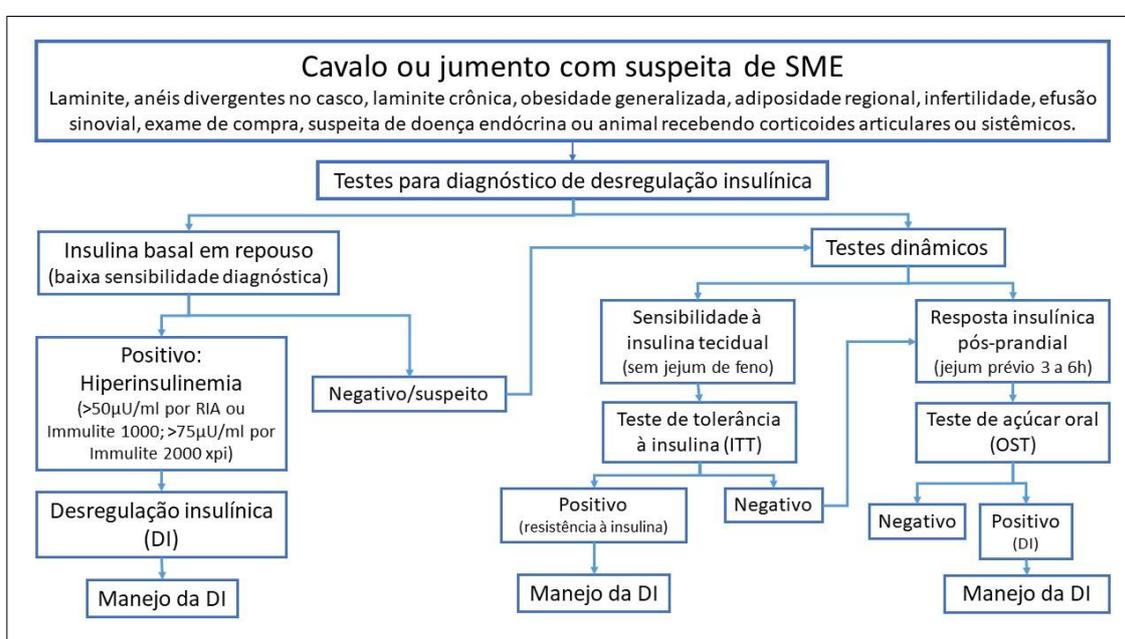


Figura 1.1 Fluxograma para o diagnóstico da desregulação insulínica, adaptado de Frank *et al.* (2020). DI: desregulação insulínica. RIA: radioimunoensaio.

### Glicemia e insulinemia

Há pouco tempo, a recomendação era que a coleta de sangue para mensuração de glicose e insulina basais fossem feitas com o animal em jejum alimentar de pelo menos 6 horas (Frank *et al.*, 2010). No entanto recomenda-se atualmente que o animal não seja submetido ao jejum total, mas apenas a restrição de grãos e alimentos ricos em carboidratos não estruturais por, pelo menos, 4-5h e repouso (Durham *et al.*, 2019; Frank *et al.*, 2020). A liberação de adrenalina ou cortisol nos equinos pelo estresse ou dor

(Frank *et al.*, 2010; Tóth *et al.*, 2010), exercícios (Votion, 2014) ou uso de glicocorticóides (Tiley *et al.*, 2007; Tóth *et al.*, 2010) reduzem a sensibilidade à insulina, portanto, a existência de qualquer destes fatores de interferência deve ser observada antes da coleta.

A hiperglicemia raramente é um achado em animais com SME, visto que existe uma resposta pancreática secretiva de insulina que caracteriza uma resistência à insulina compensada (Frank *et al.*, 2010; McCue *et al.*, 2015). Entretanto, em animais que apresentam hiperglicemia, o diagnóstico de diabetes mellitus não pode ser descartado (Durham *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2010; Durham *et al.*, 2019).

Como ilustrado na figura 1.1, de acordo com o manual do *Equine Endocrinology Group* (Frank *et al.*, 2020), considera-se que o animal apresenta DI quando sua insulinemia em jejum está acima de 50  $\mu\text{U/ml}$  ou 75 $\mu\text{U/ml}$ , dependendo de qual equipamento foi utilizado na mensuração. Já o último Consenso dos Colégios Americano e Europeu de Medicina Interna Veterinária (Durham *et al.*, 2019) considerou anormais valores acima de 20  $\mu\text{IU/mL}$ , aferido por radioimunoensaio. Apesar da existência destes padrões, não se pode descartar que um animal seja insulino-resistente utilizando unicamente esta mensuração, que, apesar de bastante específica para o diagnóstico, é pouco sensível (Toribio e Burns, 2017, Frank *et al.*, 2020).

Devem-se observar os valores de referência de acordo com o equipamento utilizado e se o mesmo foi validado para uso em equinos (Frank *et al.*, 2010), pois o radioimunoensaio, por exemplo, foi utilizado para estabelecer o valor máximo de insulinemia de equinos sadios, mas não é encontrado com facilidade para ser feito comercialmente (Toribio e Burns, 2017). Alguns estudos têm utilizado a quimiluminescência como opção ao radioimunoensaio para a mensuração de insulina nos equinos (Köller *et al.*, 2016; Carslake *et al.*, 2017; Durham *et al.*, 2019), no entanto, há indícios de que os valores de referência para detecção de hiperinsulinemia precisam ser reavaliados devido à subestimação pelo método (Carslake *et al.*, 2017).

Para tentar contornar o problema da pouca sensibilidade da mensuração simples de glicose e insulina, Treiber *et al.* (2005), sugeriram e testaram indicadores indiretos, ou “proxies”, para determinar a sensibilidade à insulina nos equinos. Os proxies foram

desenvolvidos na medicina humana e consistem em valores obtidos por fórmulas que utilizam mensurações basais de insulina e glicose, e o valor final é analisado segundo valores de referência estabelecidos para equinos ou por comparação dentro de populações ou ao longo do tempo. As fórmulas, ou proxies, seguem:

$$\text{HOMA} = (\text{glicose} - \text{insulina})/22,5$$

$$\text{RISQI} = 1/\sqrt{\text{insulina}} = \text{insulina}^{-0,5}$$

$$\text{G:I} = \text{glicose}/\text{insulina}$$

$$\text{MIRG} = (800 - 0,3 [\text{insulina} - 50]^2) / (\text{glicose} - 30)$$

$$\text{QUICKI} = [\log (\text{glicose} + \text{insulina})]^{-1}$$

A tradução literal das siglas de cada proxie é: modelo de avaliação de homeostase (HOMA), razão da raiz quadrada da insulina (RISQI), razão glicose e insulina (G:I), razão insulina-glicose modificada (MIRG) e índice quantitativo de sensibilidade à insulina (QUICKI). No estudo original de Treiber *et al.* (2005), a utilização dos proxies foi validada comparando-se os resultados obtidos por meio do teste FSIGTT, considerado o padrão ouro, como já citado. Os proxies são úteis especialmente na mensuração repetida (acompanhamento de animal resistente à insulina) ou avaliação simultânea de um número grande de animais quanto à resistência à insulina. Abaixo, a tabela 1.1 contendo os quintiles para RISQI e MIRG, sendo que, para o primeiro menores quintiles refletem menor sensibilidade à insulina e no caso do segundo maiores quintiles representam maior resposta insulínica aguda à glicose. No caso do proxie HOMA, segundo Treiber *et al.* (2005), menores valores estão correlacionados a maior sensibilidade à insulina, enquanto para G:I e QUICKI menores valores refletem menor sensibilidade à insulina. A razão glicose-insulina pode ser considerada normal acima de 10, entre 4,5 e 10 é indicativa de resistência à insulina compensada e abaixo de 4,5 considera-se que o animal apresenta resistência à insulina descompensada (Frank, 2011).

Tabela 1.1. Valores de referência em quintiles para os proxies RISQI e MIRG para a espécie equina. Adaptado de Treiber *et al.* (2005).

---

### Quintiles

---

<i>Proxies</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>RISQI (mU/L)<sup>-0,5</sup></b>	0,152- 0,295	0,296- 0,335	0,336- 0,393	0,394- 0,470	0,471- 0,953
<b>MIRG (mU<sub>insulina</sub><sup>2</sup>/[10*1*mg<sub>glicose</sub>])</b>	1,20-2,12	2,13-3,48	3,49-4,54	4,55-5,27	5,27- 10,67

Lewis *et al.* (2018) estimaram um novo proxy para uma população de cavalos árabes, utilizando o MIRG e a relação circunferência torácica/altura de cernelha que é capaz de prever a SME, mostrando que novos modelos adequados à cada raça podem ser benéficos para tornar o diagnóstico possível com apenas uma visita ao haras, por exemplo, e utilização de coleta de sangue única. Bröjer *et al.* (2015) mostraram que os proxies RISQI, MIRG e HOMA-IR apresentam boa correlação com o teste padrão ouro EHC, porém os proxies foram pouco sensíveis para detectar mudanças na sensibilidade à insulina induzida pela dieta de alto grão. Já Ribeiro (2017) observou alteração significativa dos proxies ao submeter cavalos da raça Mangalarga Marchador à dieta hipercalórica. No entanto, o grupo de pesquisadores do *Equine Endocrinology Group* (Frank *et al.*, 2020) enfatizaram no seu guia de recomendações que os proxies não substituem a realização dos testes dinâmicos.

### **Testes dinâmicos**

Os testes dinâmicos se baseiam na resposta do organismo ao desafio por carboidratos, orais ou intravenosos, ou por insulina. Nos testes orais a resposta simula o que ocorre com a insulinemia e glicemia após a alimentação, enquanto os testes intravenosos permitem a avaliação da sensibilidade tecidual à insulina e resposta das células beta-pancreáticas (Durham *et al.*, 2019).

De Laat *et al.* (2016) mostraram que o teste de tolerância à glicose oral é mais fidedigno na avaliação da desregulação insulínica comparado aos testes de tolerância à glicose intravenosa devido ao efeito aditivo das incretinas sobre a secreção de insulina, visto que estes hormônios são secretados apenas pelo intestino estimulado por nutrientes. Esta ação do eixo enteroinsular nos equinos causa uma resposta insulínica mais expressiva

no teste dinâmico oral comparado ao intravenoso (Dühlmeier *et al.*, 2001). Em contrapartida, Chameroy *et al.* (2016) observaram aumento da área sob a curva de glicose utilizando o teste de tolerância à insulina modificado em equinos com síndrome metabólica submetidos a dieta rica em grãos ao longo de oito semanas, mas não observaram aumento utilizando o teste de tolerância à glicose oral. Segundo os autores, a causa pode ter sido a diferença de momentos dos testes, a lenta absorção intestinal da glicose oral comparada à dextrose intravenosa, ou a duração insuficiente do teste da glicose oral, realizado em 180 minutos. Outro detalhe importante na realização dos testes orais, é que variações e adaptações quanto à fonte de açúcar utilizado e intervalo de coleta das amostras devem ser validados previamente (Lindase *et al.*, 2016). Nos tópicos seguintes serão descritos brevemente os testes de tolerância à glicose ou açúcar oral, teste combinado de glicose e insulina intravenosos e teste de tolerância insulínica.

### **Teste de açúcar oral e teste de tolerância à glicose oral**

Para a realização destes testes, é recomendável o jejum prévio de 3 a 12 horas, podendo-se oferecer feno (0,2-0,4 kg/100 kg PV) na noite anterior ao teste (Frank *et al.*, 2018; Durham *et al.*, 2019). Bertin *et al.* (2016) recomendam retirar a comida apenas 3 horas antes e destacam que a resposta insulinêmica pode variar com o tempo de jejum. No teste de açúcar oral, é oferecida ao animal a dose de 15 ml para cada 100 Kg de PV de xarope de milho (Karo<sup>®</sup>) e coletas de sangue para mensuração insulina são realizadas aos 60 e 90 minutos. Se em qualquer dos momentos a insulina mensurada por radioimunoensaio for maior que 60 $\mu$ IU/ml considera-se que o animal apresenta desregulação insulínica (Toribio e Burns, 2017; Durham *et al.*, 2019). Recentemente, o Equine Endocrinology Group sugeriu um limite de insulina mais baixo, de 45  $\mu$ IU/ml, utilizando o mesmo equipamento (Durham *et al.*, 2019; Frank *et al.*, 2020). Diferentes doses do xarope de glicose e diferentes valores de referência para a insulina são descritos como adaptações da técnica a outros equipamentos de mensuração de insulina e diferentes populações de animais (Manfredi, 2016; Jocelyn *et al.*, 2018; Frank *et al.*, 2018).

O teste de tolerância à glicose oral consiste na administração de glicose ou dextrose em pó na dose de 0,25 a 1g/kg de PV misturado em 450g de alimento de baixo índice

glicêmico ou em solução a 20% administrada via sonda nasogástrica (Ralston, 2002; Toribio e Burns, 2017). Após 2h é realizada a coleta de sangue para mensuração de insulina (Toribio e Burns, 2017). Valores acima de 68 ou 80-90 $\mu$ IU/ml mensurados por quimioluminescência são considerados condizentes com desregulação insulínica dependendo da dose de glicose/dextrose utilizada no teste (Frank *et al.*, 2018; Durham *et al.*, 2019). Mensurações repetidas a cada 30 ou 60 minutos até seis horas após a administração da dextrose tornam o diagnóstico mais preciso ao permitir a avaliação das curvas de glicose e insulina. Os picos de glicose (120-180mg/dL) e insulina (60-150  $\mu$ UI/ml) devem ocorrer após 1-2h e 1,5 e 2,5h, respectivamente, e o retorno aos valores basais após 4 a 5h (Ralston, 2002). Assim como no teste de açúcar oral, os valores de referência para considerar que o animal apresenta desregulação insulínica variam de acordo com o equipamento utilizado na mensuração, a dose de dextrose e a população de equinos estudada (de Laat e Sillence, 2017; Meier *et al.*, 2018; Durham *et al.*, 2019).

#### **Teste combinado de glicose e insulina intravenosos (CGIT)**

Para o teste combinado de insulina com glicose (CGIT) é inserido um cateter na jugular do animal na noite anterior. Após a coleta de amostras basais para a mensuração de glicose e insulina, realiza-se a infusão intravenosa de 150 mg/kg de glicose/dextrose (solução a 50%) seguida por 0,1 UI / kg de insulina (Burns e Toribio, 2017; Durham *et al.*, 2019). O sangue é coletado para mensuração de glicose nos tempos 0, 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 minutos (Eiler *et al.*, 2005; Toribio e Burns, 2017). E a insulina é mensurada aos 45 minutos. O animal é considerado resistente à insulina se qualquer das mensurações de glicose após as infusões estiver acima da basal ou se a insulina estiver maior que 100 $\mu$ UI/ml (Toribio e Burns, 2017). Pode-se reduzir as coletas mensurando tanto a insulina quanto a glicose apenas na amostra basal e após 45 e 75 minutos. Considera-se que a concentração de insulina deve estar abaixo de 20  $\mu$ IU/mL na amostra basal e aos 75 minutos e permanecer abaixo de 100  $\mu$ IU/mL aos 45 minutos quando se mensura a mesma com radioimunoensaio (Durham *et al.*, 2019). É importante avisar ao proprietário que o animal pode entrar em hipoglicemia, apresentando sudorese e fasciculações musculares, e, por isso, deve-se ter à mão uma solução de dextrose para tratar esta possível complicação durante o teste (Toribio e Burns, 2017; Durham *et al.* 2019).

### **Teste de tolerância insulínica (ITT)**

O teste de tolerância à insulina (ITT) mede a resposta glicêmica à insulina exógena, avaliando diretamente a captação de glicose dependente de insulina e a sensibilidade à insulina (Durham *et al.*, 2019). A forragem é disponibilizada livremente durante o teste para reduzir o risco de hipoglicemia clínica, que é um dos maiores riscos da técnica (Caltabilota *et al.*, 2009; Durham *et al.*, 2019). O teste consiste na administração de 0,02 a 0,125 UI/kg de insulina IV e avaliação da glicemia em 20-30 minutos e 2 horas (Caltabilota *et al.*, 2010). A glicemia deve cair para 50% ou menos da concentração inicial dentro de 20 a 30 minutos após e retornará aos níveis basais em 2 horas, mas em cavalos com RI, a concentração de glicose no sangue permanecerá alta por mais tempo e retornará ao basal antes. Bertin e Sojka-Kritchevsky (2013) propuseram um protocolo ainda mais simples, mensurando-se a glicose antes e 30 minutos após 0,1 UI/kg de insulina, administrando caso necessário, dextrose intravenosa para controlar a hipoglicemia. O resultado é baseado no cálculo do tempo no qual a glicose alcançará 50% do valor basal, e caso seja após 30 minutos, o animal é considerado insulino-resistente.

### **Exames laboratoriais indicativos de SME**

Como dito nos tópicos anteriores, a SME é acompanhada de diversos distúrbios no metabolismo de lipídios, incretinas, adipocinas e citocinas, tal como ocorre na síndrome metabólica em humanos, portanto, existem exames adjuvantes no diagnóstico que serão comentados nesta seção.

Lewis *et al.* (2017) relacionaram a SME a um alelo genético, o qual também estava associado a elevadas concentrações de triglicérides e colesterol na população estudada, reforçando que animais com SME apresentam desregulação no metabolismo de gorduras. No entanto, apesar da hipertrigliceridemia ser um achado frequente em equinos com síndrome metabólica (Treiber *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2006), ainda não pode ser considerado um teste diagnóstico confiável (Durham *et al.*, 2019).

A adiponectina e a leptina estão relacionadas à laminite endocrinopática (Caltabilota *et al.*, 2009; Menzies-Gow *et al.*, 2017), porém carecem de estudos que estabeleçam valores de referência e valor diagnóstico das adipocinas na SME (Durham *et al.*, 2019).

Chameroy *et al.* (2016) mensuraram a incretina GLP-1 em equinos normais e portadores de SME e não observaram diferença significativa entre os grupos. Mostrando que, apesar desta incretina elevar a insulinemia, não pode ser utilizada isoladamente no diagnóstico da SME.

Basinska *et al.* (2015) observaram aumento da interleucina-6 sérica em pôneis com síndrome metabólica comparados a pôneis obesos livres da condição, sugerindo, de acordo com estes resultados, a mensuração de citocinas inflamatórias poderia auxiliar no diagnóstico da SME. Hoolbrok *et al.* (2012) relataram aumento do estresse oxidativo em equinos obesos e com DI, mas sem histórico de laminite, sugerindo que estes animais estavam mais suscetíveis ao desenvolvimento da afecção. Considerando que as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio participam do dano tecidual e falha de órgãos observados na laminite séptica (Burns *et al.*, 2011; Laskoski *et al.*, 2016; Leise, 2018), seu estudo pode ter valor diagnóstico futuramente.

Como dito anteriormente, o IGF-1 parece estar intimamente ligado à fisiopatologia da laminite endocrinopática. A mensuração de IGF-1 em seres humanos é utilizada como marcador de resistência insulínica (Sesti *et al.*, 2005). No entanto em equinos os resultados são conflitantes. Menzies-Gow *et al.* (2017) relataram em um estudo longitudinal que os valores de IGF-1 foram capazes de prever o desenvolvimento de laminite em pôneis após 2 anos da coleta, mas não após 1 ou 3 anos, e por isso os autores consideraram que sua mensuração não foi eficaz para prever o risco de laminite endocrinopática. Meier *et al.* (2020) relataram menores valores de IGF-1 plasmático correlacionados a um maior risco de desenvolvimento de laminite em pôneis.

A ação do IGF-1 está intimamente relacionada à presença das respectivas proteínas ligantes a IGF (IGFBPs), que, apesar de aumentar a meia vida disponível deste fator de crescimento, pode também competir pelo sítio do receptor dependendo da situação (Pollak, 2004). A razão entre o IGF-1 livre e o IGFBP-3 (uma das proteínas transportadora de IGF-1), por exemplo, apresenta forte correlação positiva com câncer

(Bohlke *et al.*, 1998; Yu e Rohan, 2000; Chokkalingam *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2013), e em indivíduos com 3 ou mais indicadores de síndrome metabólica e sem diabetes, os níveis de IGF-1 estavam reduzidos, porém os de IGFBP-3 foram maiores que em indivíduos saudáveis (Saydah *et al.*, 2009). Considerando os estudos médicos e veterinários em síndrome metabólica, existe a possibilidade de que estudos futuros em equinos encontrem uma forma de utilizar o IGF-1 como diagnóstico, considerando sua forma livre ou ligada a proteínas, a fase da laminite e possivelmente outros fatores como raça e dieta.

### 1.3.3. Diagnóstico diferencial

#### **Disfunção da Pars Intermedia e Pituitária (DPIP)**

A doença de Cushing equina ou disfunção da pars intermedia e pituitária (DPIP) é a segunda causa de laminite endocrinopática no cavalo e é caracterizada por um estado de hiperadrenocorticismo, redistribuição de peso (perda de musculatura epaxial, adiposidade regional e abdômen abaulado), poliúria e polidipsia, resistência à insulina e laminite, esta última geralmente mais severa que na SME (Walsh, 2009; Johnson, 2017b; Ireland e McGowan, 2018). O teste para DPIP é recomendado como diagnóstico diferencial da SME em animais acima de 10 anos de idade (Durham *et al.*, 2019). A presença de hirsutismo, chamado também de hipertricose, é considerado patognomônico de DPIP (Messer, 1999), especialmente em cavalos com mais de 15 anos (McGowan *et al.*, 2013), porém não se pode excluir a doença por este parâmetro, sendo necessários exames laboratoriais (Toribio e Burns, 2017).

A glândula pituitária possui corticotropos (secretam adrenocorticotrofina - ACTH, e  $\alpha$  e  $\beta$ -lipotrofina - LPH) na região da pars distalis, e melanotropos (secretam hormônio estimulador de melanócitos  $\alpha$  e  $\beta$  - MSH, peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotrofina - CLIP, e peptídeos relacionados com  $\beta$ -endorfina -  $\beta$ END) na região da pars intermedia, e o precursor dos hormônios de ambas as regiões é a pro-opiomelanocortina (POMC) (Love, 1993; Messer, 1999). A hipertrofia e hiperplasia dos melanotropos aumenta a síntese de POMC, aumentando a capacidade esteroidogênica do ACTH diretamente e por estímulo do MSH e  $\beta$ END elevados, resultando em aumento da produção de cortisol, perda do ritmo circadiano do cortisol e insensibilidade dos

melanotropos ao *feedback* negativo que deveria ser causado pelos glicocorticóides circulantes (Messer, 1999). Além disso, a degeneração dos neurônios inibitórios dopaminérgicos na pars intermedia é apontada como um dos fatores determinantes para o aumento da secreção hormonal na DPIP (McFarlane *et al.*, 2005; Grenager, 2010; Ireland e McGowan, 2018).

Existem vários testes laboratoriais descritos na literatura para o diagnóstico da DPIP, dos quais podemos citar: teste de supressão por dexametasona, concentração basal de ACTH, teste de estimulação por hormônio liberador de tirotrófina (TRH), concentração basal de  $\alpha$ -MSH, teste combinado de supressão da dexametasona e TRH, cortisol basal, teste de estimulação por ACTH, insulina e glicose basais, teste de resposta à domperidona (Toribio e Burns, 2017). Cada teste tem limitações quanto a custo, excesso de manipulação e venopunções, estresse do animal, estação do ano (a pars intermedia é mais ativa no outono, confundindo o diagnóstico), e/ou pela confiabilidade do diagnóstico (Grenager, 2010). O uso de testes que mensuram o ritmo circadiano do cortisol, por exemplo, é pouco confiável no diagnóstico da DPIP nos equinos, sofrendo influência de diversos fatores, como estresse, idade e fatores ambientais (Walsh *et al.*, 2009; Cordero *et al.*, 2012). Sendo assim, Toribio e Burns (2017) sugeriram uma sequência de investigação clínica representada no fluxograma da figura 1.2 para a realização do diagnóstico.

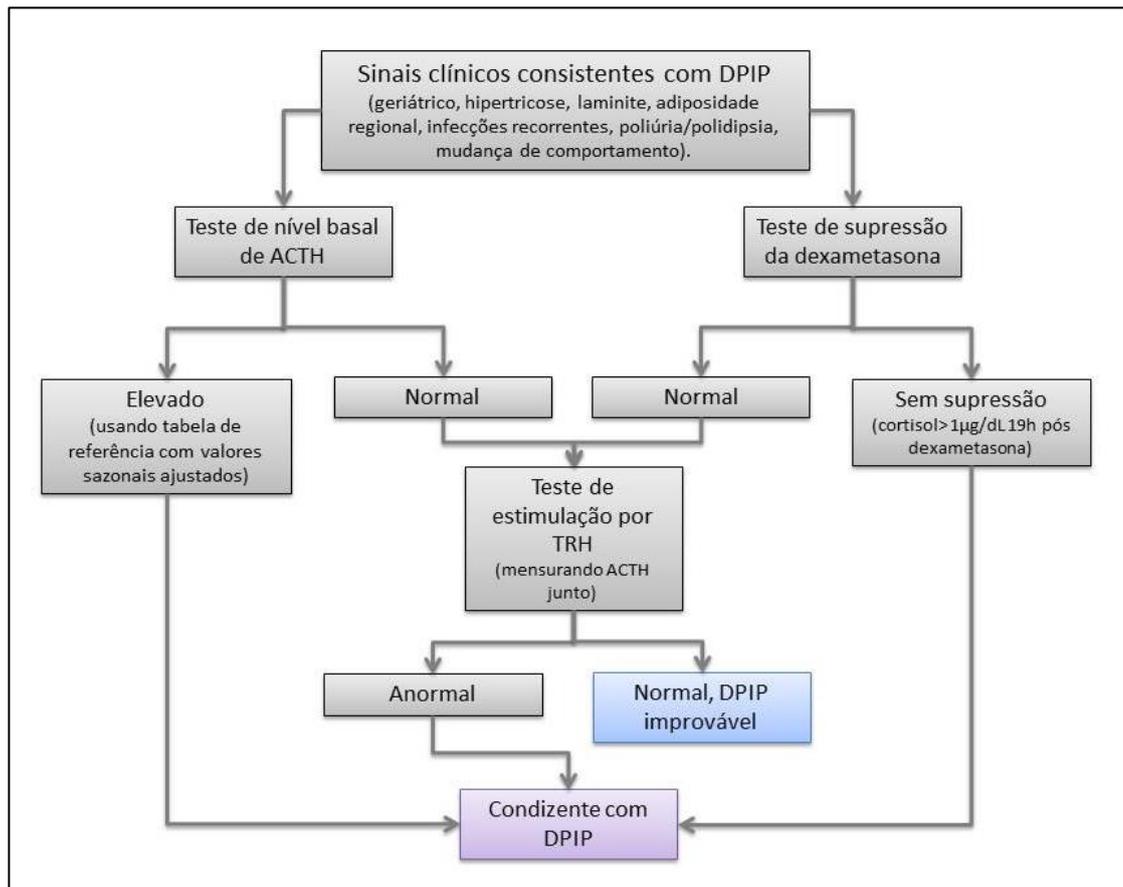


Figura 1.2. Fluxograma para diagnóstico de DPIP em equinos. Adaptado de Toribio e Burns (2017).

O teste de supressão da dexametasona é baseado na supressão que a dexametasona realiza na pars distalis, reduzindo a concentração de ACTH e, por consequência, de cortisol. No entanto, em animais com DPIP, o ACTH e o cortisol encontram-se elevados pela produção da pars intermedia, não inibida pelos glicocorticóides. Para a realização do protocolo, coleta-se uma amostra de sangue do animal para mensurar cortisol ao fim da tarde administra-se 40µg/kg de dexametasona intramuscular, e coleta-se outra amostra após 19 horas. Em animais saudios o cortisol pós-dexametasona é menor que 1µg/dL, e a ausência de supressão é indicativa de falha no eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) (Toribio e Burns, 2017).

A mensuração de ACTH basal é realizada a partir do plasma. Animais com DPIP apresentam valores acima dos valores de referência, os quais variam de acordo com o tipo de imunoenensaio utilizado e com a estação do ano no hemisfério norte (Toribio e Burns, 2017).

Para o teste de estimulação por TRH é coletada uma amostra basal, administra-se 1mg de TRH intravenoso, e coleta-se uma amostra após 10 a 30 minutos. É mensurado cortisol e ACTH das amostras e espera-se que cavalos com DPIP tenham suas concentrações de cortisol duplicadas e ACTH quatro vezes mais altas após o estímulo do TRH (Toribio e Burns, 2017). Este teste é o recomendado pelo *Equine Endocrinology Group*, podendo ser combinado ao teste de tolerância à insulina (ITT) a fim de se diagnosticar a desregulação insulínica e realizar o manejo do animal de acordo com os achados (Frank *et al.*, 2020).

O diagnóstico da DPIP utilizando diagnóstico por imagem também é possível por meio de radiografia contrastada por venografia (Levy *et al.*, 1993 citado por van der Kolk *et al.*, 1995) ou tomografia computadorizada (Allen *et al.*, 1988 citado por van der Kolk, 1994; Madrigal *et al.*, 2018), observando-se diretamente o adenoma pituitário, porém existem os limitantes do equipamento e necessidade de submeter o animal à anestesia (Van der Kolk *et al.*, 1995).

### **Diabetes e hipotiroidismo**

O Diabetes Mellitus, apesar de raramente reportado na literatura para a espécie equina, deve ser levado em consideração especialmente em animais idosos que apresentem poliúria e polidipsia (Durham *et al.*, 2009). O diabetes pode ser secundário à DPIP ou proveniente de um estado de resistência à insulina crônica não relacionado à DPIP (Loeb *et al.*, 1966; Durham *et al.*, 2009; Durham, 2017a). Os animais diabéticos apresentam um estado de resistência à insulina concomitante com hiperglicemia persistente, sendo o diagnóstico possível por meio dos testes dinâmicos de tolerância à glicose (Durham *et al.*, 2009; Durham, 2017a).

Acreditava-se há décadas atrás que cavalos com perda de peso, obesidade, laminite, problemas reprodutivos ou desempenho ruim pudessem ter hipotiroidismo, no entanto esta enfermidade é rara na espécie equina (Toribio e Burns, 2017). Na verdade, apesar de relatado tratamento de animais supostamente sofrendo de hipotiroidismo, há dúvidas quanto a sua existência em cavalos adultos (Mooney e Murphy, 1995; Breuhaus, 2011; Durham, 2017b). O diagnóstico de hipotiroidismo está sujeito a muitos vieses, visto que os hormônios tiroídianos são influenciados por diversos fatores externos, como

medicações (fenilbutasona, corticóides), jejum, exercícios extenuantes, dietas com alta energia, suplementação com proteína, zinco e cobre (Breuhaus, 2011). Opções para o diagnóstico incluem a mensuração dos valores basais de T3, T4 e TSH, sabendo-se que a confiabilidade do diagnóstico estará sujeita às alterações supracitadas, ou teste dinâmico de estimulação por TSH ou TRH. Para o teste dinâmico coleta-se uma amostra basal e duas amostras, 2 e 4 horas após a administração de 1mg de TRH ou 5UI de TSH intravenoso. O valor de T3 deve dobrar após 2 horas, e de T4 após 4 horas nos animais sadios (Breuhaus, 2011).

#### **1.4 Considerações finais**

O estudo da SME está em constante aprofundamento e discussão no mundo inteiro. Atualmente a fisiopatologia da SME engloba fatores genéticos, metabólicos, endócrinos e nutricionais que possam predispor ao desenvolvimento da laminite endocrinopática, considerando-se a desregulação insulínica um dos pilares da sua fisiopatogenia. A terminologia “resistência insulínica” já foi utilizada como sinônimo de desregulação insulínica pela literatura. No entanto a distinção tornou-se necessária, visto que a primeira se refere apenas à resposta tecidual à presença de insulina e a segunda abrange a resposta insulínica do eixo enteroinsular, estimulada pelas incretinas.

O diagnóstico da SME pode ser realizado a partir do histórico somado a testes laboratoriais factíveis a campo, considerando-se sempre vieses relacionados ao fenótipo, à idade do animal, presença de doenças concomitantes, raça e estação do ano. Formas de diagnóstico mais simples são propostas frequentemente na literatura, mas podem não ser aplicáveis a qualquer raça ou utilizar equipamentos de análise laboratorial obsoletos que prejudiquem a reprodução da técnica em outros lugares. Portanto, são de suma importância conhecer os limitantes do método escolhido e considerar o quadro clínico do animal examinado, realizando, quando necessário, diagnóstico diferencial.

#### **1.5 Referências bibliográficas**

ALLEN, J. R., BARBEE, D. D., CRISMAN, M. V. Diagnosis of equine pituitary tumors by computed tomography. *I. Comp. Cont. Educ. Pract.*, v. 10, n. 9, p. 1103-1107, 1988.

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.

BAILEY, S. R., CHOCKALINGHAM, S. Proliferative effects of insulin on equine lamellar epithelial cells mediated by the IGF-1 receptor. *J. Equine Vet. Sci.*, v.30, n.2, p. 96, 2010.

BAMFORD, N. J., POTTER, S. J., HARRIS, P. A., BAILEY, S. R. Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 47, p.101-107, 2014.

BAMFORD, N. J., POTTER, S. J., HARRIS, P. A., BAILEY, S. R. Effect of increased adiposity on insulin sensitivity and adipokine concentrations in horses and ponies fed a high fat diet, with or without a once daily high glycaemic meal. *Equine Vet. J.*, v. 48, n. 3, p. 368-373, 2016.

BARTESAGHI, S., RADJ, R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.*, v. 14, p. 618-625, 2018.

BASINSKA, K., MARYCZ, K., ŚMIESZEK, A., NICPOŃ, J. The production and distribution of IL-6 and TNF- $\alpha$  in subcutaneous adipose tissue and their correlation with serum concentrations in Welsh ponies with equine metabolic syndrome. *J. Vet. Sci.*, v.16, n.1, p. 113-120, 2015.

BERTIN, F. R., SOJKA-KRITCHEVSKY, J. E. Comparison of a 2-step insulin-response test to conventional insulin-sensitivity testing in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 44, n. 1, p. 19-25, 2013.

BOHLKE, K., CRAMER, D., TRICHOPOULOS, D., MANTZOROS, C. Insulin-Like Growth Factor-I in Relation to Premenopausal Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *Epidemiology*, v. 9, n. 5, p. 570-573, 1998. Retrieved September 19, 2020, from <http://www.jstor.org/stable/3702538>

BREUHAUS, B. A. Disorders of the equine thyroid gland. *Equine Pract.*, v. 27, n.1, p. 115-128, 2011.

BRÖJER, J., LINDÅSE, S., MÜLLER, C., NOSTELL, K. Comparison between the euglycemic-hyperinsulinemic clamp and the use of proxies for determination of insulin sensitivity in horses. *Acta Vet. Scand.*, v. 57, n. S1, p. O3, 2015.

BURNS, T. A., WESTERMAN, T., NUOVO, G. J., *et al.* Role of oxidative tissue injury in the pathophysiology of experimentally induced equine laminitis: a comparison of 2 models. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 25, n. 3, p. 540-548, 2011.

BURNS, T. A., WATTS, M. R., WEBER, P. S., *et al.* Effect of Dietary Nonstructural Carbohydrate Content on Activation of 5'-Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase in Liver, Skeletal Muscle, and Digital Laminae of Lean and Obese Ponies. *J. Vet. Intern. Med.*, v.28, n.4, p.1280-1288, 2014.

BURNS, T. A., TORIBIO, R. E. Metabolic Syndrome in Humans and Horses: The Relationship Between Obesity and Insulin Resistance. In: Belknap, J. K., Geor, R. J. (Eds.). *Equine Laminitis*. John Wiley & Sons, 2017, p. 149-166.

CALTABILOTA, T. J., THOMPSON, D. L., CLAVIER, S. E., *et al.* Evaluation of the Combined Intravenous Glucose and Insulin Test for Assessing Insulin Sensitivity. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 29, n. 5, p. 409–410, 2009. doi:10.1016/j.jevs.2009.04.108

CARSLAKE, H. B., PINCHBECK, G. L., MCGOWAN, C. M. Evaluation of a chemiluminescent immunoassay for measurement of equine insulin. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 31, n. 2, p. 568-574, 2017.

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, 2009a.

CARTER, R. A., MCCUTCHEON, L. J., GEORGE, L. A., *et al.* Effects of diet-induced weight gain on insulin sensitivity and plasma hormone and lipid concentrations in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.70, n.10, p.1250-1258, 2009b.

CHAMEROY, K. A., FRANK, N., ELLIOTT, S. B., BOSTON, R. C. Comparison of plasma active glucagon-like peptide 1 concentrations in normal horses and those with equine metabolic syndrome and in horses placed on a high-grain diet. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 40, p. 16-25, 2016.

CHOKKALINGAM, A. P., POLLAK, M., FILLMORE, C. M., *et al.* Insulin-like growth factors and prostate cancer: a population-based case-control study in China. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomarkers*, v. 10, n. 5, p. 421-427, 2001.

CORDERO, M., BRORSEN, B. W., MCFARLANE, D. Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 43, n. 4, p. 317-324, 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. *Vet. J.*, v.197, n.2, p.302-306, 2013.

DE LAAT, M. A., MCGREE, J. M., SILLENCE, M. N. Equine hyperinsulinemia: investigation of the enteroinsular axis during insulin dysregulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.310, n.1, p.E61-E72, 2016.

DE LAAT, M. A., SILLENCE, M. N. The repeatability of an oral glucose test in ponies. *Equine Vet. J.*, v. 49, n. 2, p. 238-243, 2017.

DE MARCHI, E., BALDASSARI, F., BONONI, A., *et al.* Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, v. 2013, 2013.

DESPRÉS, J. P., LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, v.444, n.7121, p. 881, 2006.

DÜHLMEIER, R., DEEGEN, E., FUHRMANN, H., *et al.* Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and the enteroinsular axis in equines (*Equus caballus*). *Comp. Biochem. Phys. A*, v. 129, n. 2-3, p. 563-575, 2001.

DURHAM, A. E.. Laminitis in Equine Metabolic Syndrome. In: Belknap, J. K., Geor, R. J. (Eds.). *Equine Laminitis*. John Wiley & Sons, 2017a, p. 196-201.

DURHAM, A. E. Therapeutics for equine endocrine disorders. *Equine Pract.*, v. 33, n.1, p. 127-139, 2017b.

DURHAM, A. E., HUGHES, K. J., COTTLE, H. J., *et al.* Type 2 diabetes mellitus with pancreatic  $\beta$  cell dysfunction in 3 horses confirmed with minimal model analysis. *Equine Vet. J.*, v. 41, n. 9, p. 924-929, 2009.

DURHAM, A. E., FRANK, N., MCGOWAN, C. M., *et al.* ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *J. Vet. Intern. Med.*, 33(2), 335-349, 2019.

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, n. 9, p. 1598–1604, 2005. doi:10.2460/ajvr.2005.66.1598

ENGELKING, L. R. Overview of Lipid Metabolism. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, Updated 2/e. Academic Press. 2010, p. 298-302.

FASSHAUER, M., KLEIN, J., NEUMANN, S., *et al.* Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.290, n.3, p.1084-1089, 2002.

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. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 228, n. 9, p. 1383-1390, 2006.

FRANK, N. Equine metabolic syndrome. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 29, n. 5, p. 259-267, 2009.

FRANK, N. Equine metabolic syndrome. *Vet. Clin. Equine*, v. 27, n. 1, p. 73-92, 2011.

FRANK, N., GEOR, R. J., BAILEY, S. R., *et al.* Equine metabolic syndrome. *J. Vet. Intern. Med.*, v.24, n.3, p.467-475, 2010.

FRANK, N., TADROS, E. M. Insulin dysregulation. *Eq. Vet. J.*, v. 46, n. 1, p. 103-112, 2013.

FRANK, N., BAILEY, S, BERTIN, F., *et al.* Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Equine Metabolic Syndrome. In: *Equine Endocrinology Group*. June 2018.

Disponível em [https://sites.tufts.edu/equineendogroup/files/2018/09/2018-Final-EMS\\_Recommendations\\_Web.pdf](https://sites.tufts.edu/equineendogroup/files/2018/09/2018-Final-EMS_Recommendations_Web.pdf) .Acessado em Julho de 2019.

FRANK, N., BAILEY, S., BERTIN, F., *et al.* Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Equine Metabolic Syndrome. In: Equine Endocrinology Group. June 2020. Disponível em: <https://sites.tufts.edu/equineendogroup/>. Acessado em setembro de 2020.

FURUKAWA, S., FUJITA, T., SHIMABUKURO, M., *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, v.114, n. 12, p.1752–1761, 2004.

GEER, E. B., SHEN, W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gender Med.*, v.6, p.60-75, 2009.

GEORGE, L. A., STANIAR, W. B., TREIBER, K. H., *et al.* Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.37, n.1, p.23-29, 2009.

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.

GRENAGER, N. How does Cushing’s disease relate to laminitis? Advances in diagnosis and treatment. *J. Equine Vet. Sci.*, v.30, n.9, p. 482-490, 2010.

GRUN, L. K., TEIXEIRA JR, N. R., VON MENGDEN, L., *et al.* TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 129, p. 286-295, 2018.

HAVEL, P. J. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr. Opin. Lipidol.*, v.13, n.1, p. 51-59, 2002.

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. 81, n.9, p.2333-2342, 2003.

IRELAND, J. L., MCGOWAN, C. M. Epidemiology of pituitary pars intermedia dysfunction: a systematic literature review of clinical presentation, disease prevalence and risk factors. *Vet. J.*, v. 235, p. 22-33, 2018.

JOCELYN, N. A., HARRIS, P. A., MENZIES-GOW, N. J. Effect of varying the dose of corn syrup on the insulin and glucose response to the oral sugar test. *Equine Vet. J.*, v. 50, n.6, p. 836-841, 2018.

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

JOHNSON, P. J. Endocrine and Metabolic Dysregulation in Laminitis: Role of Corticosteroids. In: Belknap, J. K., Geor, R. J. (Eds.). (2017a). *Equine Laminitis*. John Wiley & Sons, 2017, p. 141-148.

JOHNSON, P. J. Laminitis in Pituitary Pars Intermedia Dysfunction. In: Belknap, J. K., Geor, R. J. (Eds.). *Equine Laminitis*. John Wiley & Sons, (2017b), p. 204-209.

JOHNSON, P. J., GANJAM, S. K., MESSER, T. I. V., *et al.* Obesity paradigm: An introduction to the emerging discipline of adipobiology. In *AAEP Proc.*, v.. 32, p. 41-50, 2006.

JONES, C. N., ABBASI, F., CARANTONI, M., *et al.* Roles of insulin resistance and obesity in regulation of plasma insulin concentrations. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.278, n.3, p.E501-E508, 2000.

JUAN, C. C., SHEN, Y. W., CHIEN, Y., *et al.* Insulin infusion induces endothelin-1-dependent hypertension in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.287, n.5, p.E948-E954, 2004.

KEARNS, C. F., MCKEEVER, K. H., ROEGNER, V., *et al.* Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. *Vet. J.*, v.172, n.3, p.460-465, 2006.

KHEDER, M. H., BAILEY, S. R., DUDLEY, K. J., *et al.* Equine glucagon-like peptide-1 receptor physiology. *PeerJ*, v.6, p. e4316, 2018.

KIM, S. P., ELLMERER, M., KIRKMAN, E. L., BERGMAN, R. N.  $\beta$ -Cell “rest” accompanies reduced first-pass hepatic insulin extraction in the insulin-resistant, fat-fed canine model. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.292, n.6, p.E1581-E1589, 2007.

KÖLLER, G., BASSEWITZ, K., SCHUSSER, G. F. Reference ranges of insulin, insulin like growth factor-1 and adrenocorticotrophic hormone in ponies. *Tierarztl. Prax. G. N.*, v. 44, n. 01, p.19-25, 2016.

LASKOSKI, L. M., LOCATELLI-DITTRICH, R., SOUSA, R. S., *et al.* Lamellar lesions in horses with systemic oxidative stress, committed by experimentally induced or naturally occurring gastrointestinal disorders. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 36, n. 8, p. 694-700, 2016.

LEE, D. H., KIM, J. Y., LEE, M. K., *et al.* Effects of a 12-week home-based exercise program on the level of physical activity, insulin, and cytokines in colorectal cancer survivors: a pilot study. *Support. Care Cancer*, v. 21, n. 9, p. 2537-2545, 2013.

LEISE, B. The role of neutrophils in equine laminitis. *Cell Tissue Res.*, v. 371, n. 3, p. 541-550, 2018.

LEVY, M., BLEVINS, W. E., JANOVITZ, E. B. Radiological diagnosis of pituitary adenoma in the horse. In: *Proceedings of the 3rd Congress of the World Equine Veterinary Association*, v 115, p. 18, 1993.

LEWIS, S. L., HOLL, H. M., STREETER, C., *et al.* A. Genomewide association study reveals a risk locus for equine metabolic syndrome in the Arabian horse. *J. Anim. Sci.*, v.95, n.3, p.1071-1079, 2017.

LEWIS, S. L., HOLL, H. M., LONG, M. T., *et al.* Use of principle component analysis to quantitatively score the equine metabolic syndrome phenotype in an Arabian horse population. *PloS one*, v. 13, n. 7, p. e0200583, 2018.

LINDÅSE, S., NOSTELL, K., BRÖJER, J. A modified oral sugar test for evaluation of insulin and glucose dynamics in horses. *Acta Vet. Scand.*, v. 58, n 1, p.64, 2016.

LOEB, W. F., CAPEN, C. C., JOHNSON, L. E. Adenomas of the pars intermedia associated with hyperglycemia and glycosuria in two horses. *Cornell Vet.*, v.56, n.4, p.623, 1966.

LOVE, S. Equine Cushing's disease. *Brit. Vet. J.*, v. 149, n.2, p.139-153, 1993.

MADRIGAL, R. G., ANDREWS, F. M., RADEMACHER, N., *et al.* Large pituitary adenoma in an 8-year-old Arabian stallion. *Equine Vet. Educ.*, v. 30, n.6, p. 295-300, 2018.

MAGALHÃES, J. F., LIMA, I. R., LIMA, *et al.* Correlation study about radiographic measurements signaling laminitis in Mangalarga Marchador mares with or without signs of overweight. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v.66, n.4, p.1023-1032, 2014.

MAGALHÃES, J. F., LIMA, L. R., PAZ, C. F., *et al.* Spatial relationship between the distal phalanx and the hoof capsule in young Campolina mares with and without obesity. *Pesq. Vet. Bras.*, v.37, n.9, p.1025-1031, 2017.

MANFREDI, J. M. Identifying breed differences in insulin dynamics, skeletal muscle and adipose tissue histology and biology. *Comparative Medicine and Integrative Biology—Doctor of Philosophy*, Michigan State University. 152p. 2016.

MARYCZ, K., MICHALAK, I., KORNICKA, K. Advanced nutritional and stem cells approaches to prevent equine metabolic syndrome. *Res. Vet. Sci.*, v. 118, p. 115-125, 2018.

MAZUR-BIALY, A., POCHEĆ, E. Riboflavin reduces pro-inflammatory activation of adipocyte-macrophage co-culture. Potential application of vitamin B2 enrichment for attenuation of insulin resistance and metabolic syndrome development. *Molecules*, v. 21, n. 12, p.1724, 2016.

MCCUE, M. E., GEOR, R. J., SCHULTZ, N. Equine metabolic syndrome: a complex disease influenced by genetics and the environment. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 35, n. 5, p.367-375, 2015.

MCFARLANE, D., DYBDAL, N., DONALDSON, M. T., *et al.* Nitration and increased  $\alpha$ -synuclein expression associated with dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction. *J. Neuroendocrinol.*, v. 17, n. 2, p.73-80, 2005.

MCGOWAN, T. W., PINCHBECK, G. P., MCGOWAN, C. M. Prevalence, risk factors and clinical signs predictive for equine pituitary pars intermedia dysfunction in aged horses. *Equine Vet. J.*, v. 45, n.1, p.74-79, 2013.

MCTERNAN, P.G., ANWAR, A., AND KUMAR, S. Relationship between fat distribution and insulin resistance. In: S. Kumar and S. O’Rahilly (Eds). *Insulin Resistance: Insulin action and its disturbances in disease*. John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 207–235.

MEIER, A. D., DE LAAT, M. A., REICHE, D. B., *et al.* The oral glucose test predicts laminitis risk in ponies fed a diet high in nonstructural carbohydrates. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 63, p.1-9, 2018.

MEIER, A. D., DE LAAT, M. A., REICHE, D. B., SILLENCE, M. N. Glucagon-like peptide-1, insulin-like growth factor-1, and adiponectin in insulin-dysregulated ponies: effects of feeding a high nonstructural carbohydrate diet and association with prospective laminitis. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 71, p. 106397, 2020.

MELLO, E. B. F. R. B. M. Obesidade, desregulação insulínica e lipidemia mista em equinos da raça mangalarga marchador. 2016. 87p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

MENZIES-GOW, N. J., HARRIS, P. A., ELLIOTT, J. Prospective cohort study evaluating risk factors for the development of pasture-associated laminitis in the United Kingdom. *Equine Vet. J.*, v.49, n.3, p.300-306, 2017.

MESSER, N. T. How to diagnose equine pituitary pars intermedia dysfunction. *Proceedings of Am. Assoc. Equine Pract.*, v. 45, p. 145-147, 1999.

MINAMINO, T., ORIMO, M., SHIMIZU, I., *et al.* A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.*, v.15, p.1082–1087, 2009. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2014>.

MOONEY, C. T., MURPHY, D. Equine hypothyroidism: the difficulties of diagnosis. *Equine Vet. Educ.*, v. 7, n.5, p. 242-245, 1995.

NANAYAKKARA, S. N., RAHNAMA, S., HARRIS, P. A., *et al.* Characterisation of insulin and IGF-1 receptor binding in equine liver and lamellar tissue: implications for endocrinopathic laminitis. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 66, p. 21-26, 2019.

NORRIS, D. O., CARR, J. A. Chemical Regulation of Feeding, Digestion and Metabolism. In: Norris, D. O., Carr, J. A. Vertebrate endocrinology. Academic Press. 2013, p. 443-481. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394815-1.00012-4>

PASS, M. A., POLLITT, S., POLLITT, C. C. Decreased glucose metabolism causes separation of hoof lamellae in vitro: a trigger for laminitis?. *Equine Vet. J.*, v. 30, p.133-138, 1998. doi:10.1111/j.2042-3306.1998.tb05132.x

PAZ, C. F. R., PAGANELA, J. C., DOS SANTOS, C. A., *et al.* Relationship between obesity, insulin and placement of plasma in equine distal phalanx of breed creole. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v. 65, n. 6, p. 1699-1705, 2013.

PETERSEN, K. F., ORAL, E. A., DUFOUR, S., *et al.* Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J. Clin. Invest.*, v. 109, n. 10, p. 1345-1350, 2002.

PETERSEN, K. F., SHULMAN, G. I. Etiology of insulin resistance. *Am. J. Med.*, v. 119, n.5A, p.10S-16S, 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, n.3, p.650-654, 2010.

PLEASANT, R. S., SUAGEE, J. K., THATCHER, C. D., *et al.* Adiposity, plasma insulin, leptin, lipids, and oxidative stress in mature light breed horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v.27, n. 3, p. 576-582, 2013.

POLLAK, M. N., SCHERNHAMMER, E. S., HANKINSON, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat. Rev. Cancer*, v. 4, n. 7, p. 505-518, 2004.

POTTER, K., STEVENS, K., MENZIES-GOW, N. Prevalence of and risk factors for acute laminitis in horses treated with corticosteroids. *Vet. Rec.*, v. 185, p. 82, 2019.

PRATT, S. E., GEOR, R. J., MCCUTCHEON, L. J. Repeatability of 2 methods for assessment of insulin sensitivity and glucose dynamics in horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 19, n.6, p. 883-888, 2005.

PRATT-PHILLIPS, S. E., GEOR, R. J., MCCUTCHEON, L. J. Comparison among the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, insulin-modified frequently sampled intravenous glucose tolerance test, and oral glucose tolerance test for assessment of insulin sensitivity in healthy Standardbreds. *Am. J. Vet. Res.*, v. 76, n.1, p. 84-91, 2015.

RADIN, M. J., SHARKEY, L. C., HOLYCROSS, B. J. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 38, n.2, p. 136-156, 2009.

RAHNAMA, S., VATHSANGAM, N., SPENCE, R., *et al.* The insulin-like growth factor-1 receptor: a potential target to treat equine endocrinopathic laminitis. In: *Global Equine Endocrine Symposium, 4th, 2020, Alemanha. Global Equine Endocrine Symposium Proceedings, Bavaria, Alemanha: 2020. p 72. (Resumo).*

RALSTON, S. L. Insulin and glucose regulation. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v. 18, n. 2, p. 295-304, 2002.

RIBEIRO, R. M. Relação entre obesidade induzida e laminite endocrinopática em equinos Mangalarga Marchador: aspectos clínicos, laboratoriais, morfométricos e patológicos. 2017. 153 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SABERI, M., WOODS, N. B., DE LUCA, C., *et al.* Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell. Met.*, v. 10, n. 5, p. 419-429, 2009.

SALINAS, C., ESPINOSA, G., MORALES, N., *et al.* Assessment of peripheral blood neutrophil respiratory burst, phagocytosis and apoptosis in obese non-insulin dysregulated horses. *Res. Vet. Sci.*, v. 132, p.127-132, 2020.

SAYDAH, S., BALLARD-BARBASH, R., POTISCHMAN, N. Association of metabolic syndrome with insulin-like growth factors among adults in the US. *Cancer Causes Control*, v. 20, n. 8, p. 1309-1316, 2009.

SESTI, G., SCIACQUA, A., CARDELLINI, M., *et al.* Plasma concentration of IGF-I is independently associated with insulin sensitivity in subjects with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes care*, v. 28, n. 1, p. 120-125, 2005.

SIES, H., JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 21, n. 7, p. 363-383, 2020.

SILVA, G. B., CÔRTE, F. D. D. L., BRASS, K. E., *et al.* Laminite crônica em equídeos da raça Crioula: características clínicas e radiográficas. *Cienc. Rural*, v. 43, n. 11, 2013.

SCHULTZ, N. E., GEOR, R. J., SPLAN, R. K., MCCUE, M. E. Factors associated with variation in the equine incretin response in a cohort of morgan horses and welsh ponies. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 28, n. 4, p. 1372, 2014.

SHANIK, M. H., XU, Y., ŠKRHA, J., DANKNER, R., ZICK, Y., ROTH, J. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?. *Diabetes care*, v. 31, Sup 2, p.S262-S268, 2008.

STEPPAN, C.M., LAZAR, M.A. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.*, v.13, p.18–23, 2002.

TILEY, H. A., GEOR, R. J., MCCUTCHEON, L. J. Effects of dexamethasone on glucose dynamics and insulin sensitivity in healthy horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 68, n. 7, p. 753-759, 2007.

TORIBIO, R. E., BURNS, T. A. Endocrine and Metabolic Evaluation in horses with Laminitis. In: Belknap, J. K., Geor, R. J. (Eds.). *Equine Laminitis*. John Wiley & Sons, 2017, p. 252-265.

TÓTH, F., FRANK, N., GEOR, R. J., BOSTON, R. C. Effects of pretreatment with dexamethasone or levothyroxine sodium on endotoxin-induced alterations in glucose and insulin dynamics in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 71, n. 1, p.60-68, 2010.

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, n. 12, p. 2114-2121, 2005.

TREIBER, K. H., KRONFELD, D. S., HESS, T. M., *et al.* Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 228, n.10, p. 1538-1545, 2006.

VAN DER KOLK, J. H., WENSING, T., KALSBECK, H. C., BREUKINK, H. J. Laboratory diagnosis of equine pituitary pars intermedia adenoma. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 12, n. 1, p.35-39, 1995.

VICK, M. M., ADAMS, A. A., MURPHY, B. A., *et al.* Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of animal science*, v. 85, n. 5, p. 1144-1155, 2007.

VOTION, D. Metabolic responses to exercise and training. In: Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., Geor, R. J. *Equine Sports Medicine and Surgery E-Book: Basic and clinical sciences of the equine athlete.* Elsevier Health Sciences. 2 ed., 2014, p. 747-767.

WALLER, A. P., KOHLER, K., BURNS, T. A., *et al.* Naturally occurring compensated insulin resistance selectively alters glucose transporters in visceral and subcutaneous adipose tissues without change in AS160 activation. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.*, v. 1812, n. 9, p. 1098-1103, 2011.

WALLER, A. P., HUETTNER, L., KOHLER, K., LACOMBE, V. A. Novel link between inflammation and impaired glucose transport during equine insulin resistance. *Vet. Immunol. Immunopathol.* , v. 149, n. 3-4, p. 208-215, 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.

WELSH, C. E., DUZ, M., PARKIN, T. D., MARSHALL, J. F. Disease and pharmacologic risk factors for first and subsequent episodes of equine laminitis: a cohort study of free-text electronic medical records. *Prev. Vet. Med.*, v. 136, p.11-18, 2017.

WILLIAMS, C. A., KRONFELD, D. S., STANIAR, W. B., HARRIS, P. A. Plasma glucose and insulin responses of Thoroughbred mares fed a meal high in starch and sugar or fat and fiber. *J. Anim. Sci.*, v. 79, n. 8, p. 2196-2201, 2001.

YU, H., ROHAN, T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 92, n. 18, p. 1472-1489, 2000.

## **CAPÍTULO 2 – Indicadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar em equinos Mangalarga Marchador induzidos à obesidade por dieta hipercalórica**

### **Resumo**

Os estudos histopatológicos do casco equino indicam, até o momento, que os desequilíbrios se iniciam no casco antes da instalação do quadro de laminite. O estresse oxidativo lamelar, resultado do desequilíbrio de processos naturais do organismo, é descrito na laminite séptica, mas não na endocrinopática, carecendo de informações sobre sua participação na falha estrutural que ocorre nesta enfermidade. Neste estudo foram utilizados 9 equinos sadios, submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses. Antes e após este período, foram coletados fragmentos das lâminas do casco por meio de biópsia, proveniente do membro torácico esquerdo inicialmente, e ao final, do membro torácico direito. Foi realizada imunohistoquímica para marcação dos metabólitos envolvidos no estresse oxidativo/nitrosativo superóxido dismutase (SOD2) e 3-nitrotirosina (NIT). Não foram observadas marcações para SOD2 em nenhum dos animais, em nenhum dos momentos estudados, porém houve marcação para NIT em quatro animais no momento final do experimento. Este achado é evidência inédita da ocorrência de espécies reativas de nitrogênio lamelar em equinos na ausência de sinais clínicos de doenças sépticas. Sugere-se, portanto, que o estresse oxidativo lamelar ocorreu nos indivíduos mais susceptíveis ao efeito potencialmente nocivo do aumento de adiposidade e do consumo de excesso de carboidratos solúveis, tornando-os sujeitos a desenvolverem síndrome metabólica e laminite endocrinopática.

### **Abstract**

Histopathological studies of the horse's hoof have so far indicated that imbalances begin in the hoof before the onset of laminitis. Oxidative stress, an imbalance of body's natural processes consequence, is related to septic laminitis, but not in endocrinopathic, lacking information about its participation in the structural failure that occurs in this disease. In this study, 9 healthy horses were used, submitted to a high calorie diet for 5 months. Before and after this period, fragments of the laminae were collected by biopsy, from the left thoracic limb initially, and from the right thoracic limb at the end. Immunohistochemistry was performed to find the oxidative/nitrosative stress metabolites superoxide dismutase (SOD2) and 3-nitrotyrosine (NIT) at the tissues. No SOD2 markings were observed in any of the animals, in any of the studied moments. NIT was

present in four animals at the end of the experiment. This finding is unprecedented evidence of the occurrence of lamellar reactive nitrogen species in horses in the absence of septic diseases. It is suggested, therefore, that the lamellar oxidative stress occurred in individuals more susceptible to the potentially harmful effect of increased adiposity and excess of soluble carbohydrates intake, making them subjects to metabolic syndrome and endocrinopathic laminitis development.

## 2.1 Introdução

O metabolismo energético aeróbio depende de reações de oxirredução (ou redox), representadas principalmente pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e enzimas NADPH oxidases, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros radicais livres que funcionam como sinalizadores, mas podem se tornar prejudiciais caso os mecanismos de remoção dos mesmos se esgotem ou não funcionem apropriadamente (Cannito *et al.*, 2010; Sies e Jones, 2020).

A 3-nitrotirosina é resultante da nitrificação de proteínas por espécies reativas de nitrogênio (RNS), principalmente o potente oxidante peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995; Keshavarzian *et al.*, 2003), que se acumula especialmente em situações pró-inflamatórias pela reação entre o óxido nítrico (NO) e o radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Cannito *et al.*, 2010). Outro mecanismo de formação da 3-nitrotirosina é a reação rápida entre radicais tirosil (que são formados pela oxidação da tirosina) com o dióxido nítrico (Eiserich *et al.*, 1995; Halliwell, 1997). Portanto, esta molécula é um marcador do estresse oxidativo e nitrosativo tecidual.

Outro marcador do estresse oxidativo bastante utilizado na pesquisa é a enzima superóxido dismutase, que faz parte da resposta antioxidante do organismo, porém sua reação é três vezes mais lenta que o óxido nítrico com o radical livre superóxido (Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995), e sua presença está relacionada a danos teciduais já estabelecidos, como tumores em humanos (Ye *et al.*, 2008; Termini *et al.*, 2011) e danos lamelares em cavalos com doenças gastrintestinais letais (Laskoski *et al.*, 2016).

As moléculas instáveis, os radicais livres resultantes das reações de oxirredução, decorrem naturalmente de processos fisiológicos (“*oxidative eustress*”) e atuam, inclusive, como sinalizadores e efetores do sistema imune, agindo contra microorganismos invasores e na

inflamação (Mandelker, 2008; Sies e Jones, 2020). Porém o acúmulo de espécies reativas, que ocorre no chamado “*oxidative distress*” (Sies e Jones, 2020), participa também da fisiopatologia dos danos teciduais e falha de múltiplos órgãos que ocorrem na sepse, despertando o interesse do seu estudo na laminite equina (Leise, 2018). O estresse oxidativo das lâminas dos cascos foi documentado e implicado na fisiopatologia da laminite séptica (Yin *et al.*, 2009; Laskoski *et al.*, 2016), mas não no modelo de laminite endocrinopática (de Laat *et al.*, 2012). Apesar de alguns autores afirmarem que não há inflamação ativa na laminite endocrinopática (Patterson-Kane *et al.*, 2018), existe migração leucocitária e dano à membrana basal em menor grau nas lâminas do casco (de Laat *et al.*, 2013) e indícios da atuação de proteínas plasmáticas de fase aguda em animais com SME (Zak *et al.*, 2020). Portanto, o estresse oxidativo permanece como um dos fatores a serem desvendados na fisiopatologia da laminite decorrente da SME.

## 2.2 Material e métodos

### *Animais e dieta*

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com o número de protocolo 49/2014. Os dados e material biológico utilizados no presente estudo são parte dos resultados obtidos do experimento conduzido por Ribeiro *et al.* (2020).

Foram utilizados 9 equinos da raça Mangalarga Marchador, 4 machos castrados e 5 fêmeas, com idade média  $\pm$  DP (desvio-padrão) de  $48 \pm 5$  meses, peso médio inicial  $\pm$  DP de  $316 \pm 62,7$  kg e escore de condição corporal (ECC) médio  $\pm$  DP de  $2,9 \pm 1$ .

Durante o período experimental a água e sal mineralizado (Coequi Plus<sup>®</sup>, 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 100% superiores à exigência de manutenção estabelecida pelo *Equine Nutrient Requirements* (NRC 2007). O cálculo da ED de manutenção (EDm) foi feito com base na fórmula matemática:  $ED = 1,4 + (0,03 \times \text{kg de peso vivo [p.v.]})$  (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 em forma de forragem. Para tanto utilizaram-se os valores disponíveis para energia digestível dos alimentos disponibilizados: concentrado comercial (Guabi Equitage Laminados<sup>®</sup>) (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:

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

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

Esse 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. A dieta foi fornecida aos animais dividida em três refeições diárias. A quantidade de amido por refeição foi calculada a partir da análise bromatológica dos componentes da dieta, cuja metodologia é descrita em Ribeiro (2017), e acusou 27% de amido no concentrado e 1,5% no feno utilizados (Ribeiro, 2017).

#### *Biópsia de cascos*

Duas amostras de cascos foram coletadas dos animais segundo a metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2017), sendo a primeira amostra retirada do casco do membro torácico esquerdo antes do início da dieta experimental e a segunda, do membro torácico direito após 150 dias.

#### *Marcações imuno-histoquímicas de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar*

Foram investigadas nas amostras de casco coletadas por biópsia as marcações para nitrotirosina e superóxido dismutase (SOD2) no tecido lamelar dos 9 cavalos, antes e após o período experimental, utilizando-se imuno-histoquímica, com o método descrito por Laskoski *et al.* (2016). Os cortes de tecido lamelar foram embebidos em parafina com 5 µm de espessura colocados em lâminas carregadas positivamente. Após a desparafinização, foi realizada recuperação antigênica com citrato de sódio em panela elétrica por 30 minutos. Um kit comercial foi usado para bloquear proteínas (DPB-125. Spring Bioscience. Pleasanton, USA)

e a peroxidase endógena (DHP-125. Spring Bioscience. Pleasanton, USA). O anticorpo monoclonal anti-3-nitrotirosina (AB61392, ABCAM) feito em camundongo foi diluído em 1:6000, e o anticorpo policlonal anti-SOD (AB13534, ABCAM) feito em coelho foi diluído em 1:4000. Ambos os anticorpos foram incubados por 60 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com polímero de imunoperoxidase universal por 30 minutos. Sofreram reação de diaminobenzidina (DAB) por 4 minutos; e posteriormente contra-coloração com hematoxilina de Harris por 30 segundos, finalizando com baterias de álcool e xilol. As lâminas foram montadas para leitura em microscopia de luz. A avaliação foi realizada por um único pesquisador, com experiência nesta imunomarcação, utilizando para fins de comparação controles negativos (com omissão do anticorpo primário e tecidos sabidamente negativos) e positivos (tecidos sabidamente positivos).

### **2.3 Resultados**

Ao final do período experimental os animais apresentavam peso médio  $\pm$  DP de  $402,77 \pm 58,31$  kg e escore de condição corporal (ECC) médio  $\pm$  DP de  $8,3 \pm 1$ . Durante o período experimental, os animais não apresentaram qualquer intercorrência clínica ou claudicação, conforme descrito no estudo anterior (Ribeiro, 2017). As quantidades de amido por refeição, calculados para cada animal, ficaram entre os valores 0,89 e 0,98g/Kg de peso vivo (PV)/refeição.

Dos 9 animais avaliados, 4 apresentaram marcação para nitrotirosina, enquanto os 5 demais tiveram marcação ausente nas biópsias obtidas após 150 dias da dieta experimental (figura 2.1). Nas amostras coletadas no início do período experimental e imunomarcação para nitrotirosina foi ausente. A imunomarcação para SOD2 foi ausente em todos os animais, nos dois momentos avaliados.

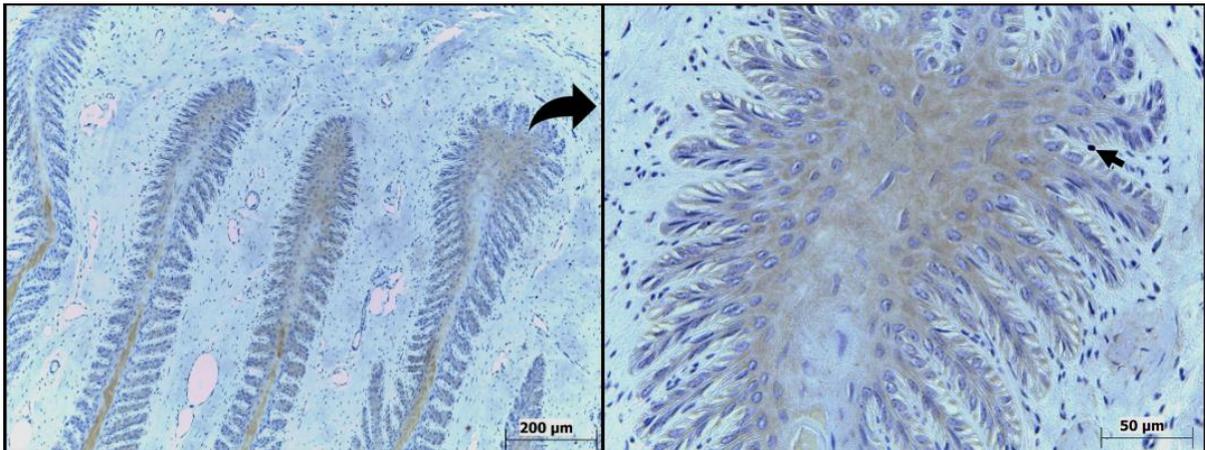


Figura 2.1. Fotomicrografia do tecido lamelar de um equino Mangalarga Marchador que apresentando imunomarcção para 3-nitrotirosina após serem submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses. A imagem da direita é parte da imagem da esquerda com maior magnificação, tal como indicado pela seta grande. Notam-se dois tipos de marcação, de forma difusa e em pontos espalhados, ambos na lâmina epidermal.

## 2.4 Discussão

A liberação de radicais livres ocorre no organismo não apenas como um resultado indesejável de desequilíbrios metabólicos, mas também como forma de sinalizar e controlar diversas reações celulares (Cannito *et al.*, 2010; Sies e Jones, 2020). Não se sabe ainda se a presença de marcadores de estresse oxidativo na SME é causa ou efeito da desregulação insulínica, estado pro-inflamatório e propensão à laminite. Holbrook *et al.* (2012) correlacionaram insulinemia e espécies reativas de oxigênio liberadas por neutrófilos na SME, mas não identificaram aumento da resposta de citocinas nestes animais comparados a um grupo controle. Em equinos com disfunção da pars intermedia e pituitaria os marcadores de estresse oxidativo plasmático sugerem relação da doença com dano oxidativo endotelial, o que poderia ser a causa da maior susceptibilidade destes animais ao desenvolvimento de laminite (Keen *et al.*, 2004). Porém, outros estudos não encontraram evidências de que o estresse oxidativo ou nitrosativo são precursores da disfunção da pars intermedia e pituitaria (MacFarlane *et al.*, 2005) ou da laminite séptica (Burns *et al.*, 2011) em equinos. Estudo de Kenéz *et al.* (2018) mostrou a ocorrência de metabólitos plasmáticos marcadores de estresse oxidativo em cavalos submetidos ao teste de glicose oral, e os autores sugeriram que o desafio do açúcar oral provoca um estado pró-inflamatório e aumenta o estresse oxidativo em cavalos com desregulação insulínica.

A nitrotirosina é resultado da reação entre espécies reativas do estresse oxidativo e nitrosativo (Sies e Jones, 2020). A peroxidação lipídica de membranas celulares libera radicais capazes de oxidar a tirosina e promover reações de nitração com dióxido de nitrogênio, formando a 3-nitrotirosina (Bartesaghi e Radi, 2018), tornando-a um marcador de danos celulares pelo estresse oxidativo. Já a superóxido dismutase 2 é uma enzima mitocondrial que gera peróxido de hidrogênio, um potente oxidante relativamente estável, a partir do radical superóxido (Sies e Jones, 2020).

A concentração de 3-nitrotirosina já foi relacionada a severidade das colites em seres humanos (Keshavarzian *et al.*, 2003; Karp e Koch, 2006) e equinos (Mirza *et al.*, 1999, Hunter, 2002). No estudo de Laskoski *et al.* (2016), a nitrotirosina não apresentou correlação com a gravidade dos danos lamelares em animais naturalmente acometidos de doenças gastrintestinais, porém estava presente naqueles acometidos por danos lamelares de grau 3. Os autores atribuíram os achados à ocorrência do estresse oxidativo antes do início dos sinais clínicos, o que concorda com a imunomarcagem encontrada no presente trabalho, já que nenhum dos animais apresentou sinais de laminite ao longo do período da dieta experimental (Ribeiro, 2017). Em humanos a relação entre a nitrotirosina e a glicemia foi documentada em indivíduos saudáveis submetidos a clamp hiperglicêmico (Marfella *et al.*, 2001) e diabéticos submetidos a uma refeição gordurosa ou com alto índice glicêmico (Ceriello *et al.*, 2005), reforçando que o maior risco de dietas hiperglicemiantes reside no dano causado pelo estresse oxidativo endotelial (Calder *et al.*, 2011). Um estudo envolvendo a marcação por nitrotirosina em biópsias cardíacas, mostrou maior ocorrência de estresse oxidativo e apoptose em indivíduos diabéticos e hipertensos (Frustaci *et al.*, 2000).

Em equinos é recomendado o consumo de amido de menos de 1,1g/Kg PV/ refeição a fim de prevenir altas respostas glicêmicas e insulinêmicas que poderiam levar à desregulação insulínica (Vervuert *et al.*, 2009). Apesar dos valores abaixo desta referência encontrados no presente estudo, o trabalho original mostrou que houve alterações metabólicas sofridas pelos animais compatíveis com o desenvolvimento de desregulação insulínica (Ribeiro, 2017), tornando claros os efeitos deletérios de uma dieta desequilibrada, que podem ter sido a causa do desenvolvimento de estresse oxidativo lamelar em alguns dos indivíduos.

A ausência de marcação para SOD2 no presente estudo concorda com Laskoski *et al.* (2016), que sugere que a ausência de estímulos para a produção deste antioxidante provocou a não marcação em lâminas de peças de abatedouro, em contraste com a imunomarcação encontrada em animais sofrendo de transtornos gastrintestinais. Loftus *et al.* (2006) também relataram a ausência de marcação de SOD2 em cascos de cavalos sadios ou com laminite induzida por extrato de noqueira preta. Estudos em humanos relacionam a expressão aumentada desta enzima antioxidante à presença e à gravidade de tumores (Ye *et al.*, 2008; Termini *et al.*, 2011).

A SOD2 reduz o dano tecidual ao catalizar a reação entre o radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ) com o hidrogênio ( $H^+$ ) gerando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), prevenindo a reação do  $O_2^{\bullet}$  com o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e geração do peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), cuja decomposição resulta em oxidantes potentes e citotóxicos (Beckman *et al.*, 1990; Barbosa *et al.*, 2010). Além disso, o próprio peroxinitrito pode atuar como inibidor da ação da enzima SOD2, aumentando ainda mais o dano oxidativo nas mitocôndrias (MacMillan-Crow *et al.*, 1996). Considerando o exposto, a ausência da marcação de SOD2 nos animais pode representar uma falta de reação ao dano tecidual causada pelo próprio peroxinitrito, que é uma das principais RNS, capaz de formar nitrotirosina.

Apesar das marcações serem consideradas resquícios, os anticorpos utilizados para identificar a nitrotirosina são capazes de distinguir entre peptídeos oxidados e não oxidados (Meredith *et al.*, 2015), e, portanto, são específicos o suficiente para que o resultado seja relevante. Considerando que equinos sem sinais clínicos de laminite geralmente não apresentam marcação para metabólitos de estresse oxidativo, os achados do presente estudo demonstram que parte dos animais foram mais susceptíveis aos danos causados pela dieta hipercalórica ao longo dos meses.

## **2.5 Conclusão**

O estresse oxidativo/nitrosativo lamelar se desenvolve em equinos induzidos à obesidade por dieta rica em carboidratos não estruturais, indicando que esse processo patológico pode estar envolvido no desenvolvimento da laminite endocrinopática associada à síndrome metabólica equina. Parte da amostra populacional não foi acometida, mostrando que, à semelhança da síndrome metabólica, nem todos os equinos são susceptíveis aos efeitos deletérios da obesidade.

## 2.6 Referências bibliográficas

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr. Campinas*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARTESAGHI, S., RADI, R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.*, v. 14, p. 618-625, 2018.

BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. W., CHEN, J., *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, n. 4, p. 1620-1624, 1990.

BURNS, T. A., WESTERMAN, T., NUOVO, G. J., *et al.* Role of oxidative tissue injury in the pathophysiology of experimentally induced equine laminitis: a comparison of 2 models. *Journal of veterinary internal medicine*, v.25, n. 3, p. 540-548, 2011.

CALDER, P. C., AHLUWALIA, N., BROUNS, F., *et al.* Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br. J. Nutr.*, 106(S3), S1-S78, 2011.

CANNITO, S., NOVO, E., DI BONZO, L. V., *et al.* Epithelial–mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. *Antiox. Redox Sign.*, v. 12, n. 12, p. 1383-1430, 2010.

CERIELLO, A., ASSALONI, R., DA ROS, *et al.* Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. *Circulation*, v. 111, n. 19, p. 2518-2524, 2005.

DE LAAT, M. A., KYAW-TANNER, M. T., SILLENCE, M. N., *et al.* Advanced glycation endproducts in horses with insulin-induced laminitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 145, n. 1-2, p. 395-401, 2012.

DE LAAT, M. A., PATTERSON-KANE, J. C., POLLITT, C. C., *et al.* Histological and morphometric lesions in the pre-clinical, developmental phase of insulin-induced laminitis in Standardbred horses. *Vet. J.*, v. 195, n. 3, p. 305-312, 2013.

EISERICH, J. P., BUTLER, J., VAN DER VLIET, A., *et al.* Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals. *Biochem. J.*, v. 310, n. 3, p. 745-749, 1995.

FRUSTACI, A., KAJSTURA, J., CHIMENTI, C., *et al.* Myocardial cell death in human diabetes. *Circ. Res.*, v. 87, n. 12, p. 1123-1132, 2000.

HALLIWELL, B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo?. *FEBS Lett.*, v. 411, n. 2-3, p. 157-160, 1997.

HOLBROOK, T. C., TIPTON, T., MCFARLANE, D. Neutrophil and cytokine dysregulation in hyperinsulinemic obese horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 145, n. 1-2, p. 283-289, 2012.

HUNTER, R. P. Nitric oxide, inducible nitric oxide synthase and inflammation in veterinary medicine. *Anim. Health Res. Rev.*, v.3, n. 2, p. 119-133, 2002.

ISCHIROPOULOS, H., AL-MEHDI, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.*, v. 364, n. 3, p. 279-282, 1995.

KARP, S. M., KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Dis. Mon.*, v. 5, n. 52, p. 199-207, 2006.

KEEN, J. A., MCLAREN, M., CHANDLER, K. J., MCGORUM, B. C. Biochemical indices of vascular function, glucose metabolism and oxidative stress in horses with equine Cushing's disease. *Equine Vet. J.*, v. 36, n. 3, p. 226-229, 2004.

KENÉZ, Á., WARNKEN, T., FEIGE, K., HUBER, K. Lower plasma trans-4-hydroxyproline and methionine sulfoxide levels are associated with insulin dysregulation in horses. *BMC Vet. Res.*, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2018.

KESHAVARZIAN, A., BANAN, A., FARHADI, A., *et al.* Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, v.52, n. 5, p.720-728, 2003.

- LASKOSKI, L. M., DITTRICH, R. L., VALADÃO, C. A. A., *et al.* Oxidative stress in hoof lamellar tissue of horses with lethal gastrointestinal diseases. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 171, p. 66-72, 2016.
- LEISE, B. The role of neutrophils in equine laminitis. *Cell Tissue Res.*, v. 371, n. 3, p. 541-550, 2018.
- LOFTUS, J. P., BELKNAP, J. K., STANKIEWICZ, K. M., BLACK, S. J. Lamellar xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the prodromal stage of black-walnut induced equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 39, n. 1, p. 48-53, 2006.
- MACMILLAN-CROW, L. A., CROW, J. P., KERBY, J. D., *et al.* Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *PNAS*, v. 93, n. 21, p. 11853-11858, 1996.
- MANDELKER L. Oxidative stress: the role of mitochondria, free radicals, and antioxidants. Preface. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 38, n. 1, p. ix-xi, 2008. doi:10.1016/j.cvsm.2007.11.009
- MARFELLA, R., QUAGLIARO, L., NAPPO, F., *et al.* Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J. Clin. Investig.*, v. 108, n. 4, p. 635-636, 2001.
- MCFARLANE, D., DYBDAL, N., DONALDSON, M. T., *et al.* Nitration and increased  $\alpha$ -synuclein expression associated with dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction. *J. Neuroendocrinol.*, v. 17, n. 2, p. 73-80, 2005.
- MEREDITH, S., SPICKETT, C., PAREKH, G., *et al.* Investigating the ability of antibodies to recognize specific oxidized protein epitopes. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 86, S31, 2015. (Resumo), disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.111>>
- MIRZA, M. H., OLIVER, J. L., SEAHORN, T. L.. Detection and comparison of nitric oxide in clinically normal horses and those with naturally acquired small intestinal strangulation obstruction. *Can. J. Vet. Res.*, v. 63, n. 4, p.230-240, 1999.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Energy. In: *Nutrient requirements of horses*. 6.ed. Rev. Washington, D.C.: National Academies, 2007, p. 3-33.

PATTERSON-KANE, J. C., KARIKOSKI, N. P., MCGOWAN, C. M. Paradigm shifts in understanding equine laminitis. *Vet. J.*, v. 231, p. 33-40, 2018.

RIBEIRO, R. M., MENDES, H. M., VALADARES, R. C., *et al.* A novel equine hoof lamellar tissue biopsy technique. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 49, p. 63-68, 2017.

RIBEIRO, R. M. Relação entre obesidade induzida e laminite endocrinopática em equinos Mangalarga Marchador: aspectos clínicos, laboratoriais, morfométricos e patológicos. 2017, 154f. Tese (Doutorado em Medicina e Cirurgia Veterinárias). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SIES, H., JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 21, n. 7, p. 363-383, 2020.

TERMINI, L., MACIAG, P. C., ETLINGER, D., ALVES, V. A. F., *et al.* Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia. *Dis. Markers*, v. 30, n. 6, p. 275-281, 2011.

VERVUERT, I., VOIGT, K., HOLLANDS, T., *et al.* Effect of feeding increasing quantities of starch on glycaemic and insulinaemic responses in healthy horses. *Vet. J.*, v. 182, n. 1, p. 67-72, 2009.

YE, H., WANG, A., LEE, B. S., *et al.* Proteomic based identification of manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) as a metastasis marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genom. Proteom.*, v. 5, n. 2, p. 85-93, 2008.

YIN, C., PETTIGREW, A., LOFTUS, J. P., *et al.* Tissue concentrations of 4-HNE in the black walnut extract model of laminitis: indication of oxidant stress in affected laminae. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 129, n. 3-4, p. 211-215, 2009.

ZAK, A., SIWINSKA, N., ELZINGA, S., *et al.* Effects of equine metabolic syndrome on inflammation and acute-phase markers in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 72, p. 106448, 2020.

### **CAPÍTULO 3 - Índices morfométricos e indicadores séricos, matemáticos e dinâmicos de desregulação insulínica em equinos com estresse oxidativo/nitrosativo lamelar pela indução experimental de obesidade**

#### **Resumo**

A síndrome metabólica equina é preocupação crescente na equideocultura devido à predisposição destes animais a desenvolverem a laminite, que pode ser uma doença fatal. Neste estudo, 9 equinos saudáveis foram submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses e foram avaliados durante este período, a cada 30 dias, quanto ao peso, escore corporal, ultrassonografia de base de cauda, medidas de pescoço, índices séricos de colesterol e frações, triglicérides, ácidos graxos não esterificados, frutamina e IGF-1. Nestes mesmos momentos foram avaliados quanto à glicemia e insulinemia basal e a partir destes dados foram calculados os *proxies* G:I, RISQI, HOMA-IR, QUICKI e MIRG. Nos dias 0, 90 e 150 foi realizado teste de baixa dose de glicose oral nos animais. Para a análise destes dados, os animais foram separados em dois grupos: positivo (NIT+) ou negativo (NIT-) para nitrotirosina lamelar, conforme descrito no capítulo anterior. Comparando-se os dados ao longo dos meses e entre os grupos, foi observado um aumento do peso e adiposidade dos animais, assim como do colesterol e frações. No entanto, este aumento foi mais significativo ou mais acentuado ao longo dos meses no grupo NIT+ comparado ao grupo NIT-. Houve correlação do IGF-1 com indicadores de desregulação insulínica, dislipidemia e adiposidade, com maior número de variáveis correlacionadas no NIT+. Ao longo dos meses houve aumento na insulinemia em jejum e na área sob a curva da resposta insulínica ao teste de baixa dose de glicose oral apenas no NIT+. Este padrão afetou igualmente os *proxies*, que acusaram resistência insulínica descompensada (G:I), reduzida sensibilidade à insulina (RISQI, HOMA-IR e QUICKI) e maior resposta insulínica aguda à glicose (MIRG) do grupo NIT+ ao final do período experimental. Os animais de NIT+, portanto, apresentaram desequilíbrio do metabolismo oxidativo nas lâminas dos cascos mesmo sem sinais clínicos de laminite, acompanhado por alterações insulínicas, morfométricas e de colesterol mais acentuadas. Em conclusão, verificou-se que o estresse oxidativo/nitrosativo lamelar está consistentemente associado às alterações de biomarcadores de síndrome metabólica, ocorrendo em equinos que apresentaram menor estatura e maior intensidade de desregulação insulínica, dislipidemia e alteração de de IGF-1 que o grupo não reativo.

Adicionalmente, verificou-se que a 3-nitrotirosina lamelar e o IGF-1 sérico têm potencial para serem marcadores de desenvolvimento de síndrome metabólica em equinos.

### **Abstract**

Equine metabolic syndrome is a concern among horse breeders due to the predisposition of these animals to develop laminitis, which can be fatal. In this study, 9 healthy horses were submitted to a high-calorie diet for 5 months and were evaluated during this period, every 30 days, for body weight, body score, tail base ultrasound, neck measurements, serum levels of cholesterol and its fractions, triglycerides, non-esterified fatty acids, fructosamine and IGF-1. Blood glucose and basal insulinemia were also evaluated and, using these data, the proxies G:I, RISQI, HOMA-IR, QUICKI and MIRG were calculated. On days 0, 90 and 150, a low-dose oral glucose test was performed on the animals, and the glucose and insulin curves were evaluated. For the statistical analysis, the animals were separated into two groups: positive (NIT+) or negative (NIT-) for lamellar nitrotyrosine, as described in the previous chapter. Comparing the data over the months and between the groups, an increase in the weight and adiposity of the animals was observed, as well as in cholesterol and fractions. However, this increase was more significant or more pronounced over the months in the NIT+ group compared to the NIT- group. In the NIT- group, there was a negative correlation of IGF-1 with weight, and a positive correlation with total cholesterol, HDL, LDL, free fatty acids and neck circumference at 25% height. There was correlation of IGF-1 with indicators of insulin dysregulation, dyslipidemia and adiposity, with a greater number of correlated variables in NIT+. Over the months NIT+ significantly increased its fasting insulinemia and insulinemic response to the low-dose oral glucose test compared to NIT-, even with values in the lower initial months. This pattern also affected the proxies, which showed decompensated insulin resistance (G:I), reduced insulin sensitivity (RISQI, HOMA-IR and QUICKI) and higher acute insulin response to glucose (MIRG) in the NIT+ group at the end of the experimental period. The NIT+ animals, therefore, showed an oxidative stress imbalance in the hoof even without clinical signs of laminitis, along with more pronounced morphometric and cholesterol changes. In conclusion, lamellar oxidative stress is consistently associated with changes in metabolic syndrome biomarkers, occurring in shorter horses, that had greater insulin dysregulation, dyslipidemia and IGF-1 changes than the non-reactive group. In addition, it was found that lamellar 3-nitrotyrosine and

serum IGF-1 have the potential to be markers of the development of metabolic syndrome in horses.

### 3.1 Introdução

Na SME, a dislipidemia e a obesidade não são mais considerados achados obrigatórios, apesar de estarem presentes em muitos casos (Durham *et al.*, 2019). O estudo destes fatores está alinhado com os achados médicos, que realizam o diagnóstico de síndrome metabólica quando o indivíduo possui pelo menos três fatores de risco, entre eles a obesidade e a hipertrigliceridemia associada a um baixo valor de HDL (Kaur, 2014). A insulina promove a formação de lipoproteínas no período pós-prandial, estimula a síntese e estocagem de triglicerídeos e inibe vias lipolíticas no tecido adiposo (Norris e Carr, 2013). Portanto, considerando que a desregulação insulínica está intimamente envolvida na fisiopatologia da SME e laminite endocrinopática, são esperadas, e comuns, as alterações significativas destes analitos. A obesidade é caracterizada pelo aumento da quantidade de tecido adiposo metabolicamente ativo, e com isso há aumento da secreção de adipocinas e citocinas causando um estado pró-inflamatório (Waller *et al.*, 2012; Burns e Toribio, 2017), e outros desequilíbrios metabólicos como a desregulação insulínica (McTernan, 2005; Burns e Toribio, 2017) e o aumento do estresse oxidativo (De Marchi *et al.*, 2013; Pleasant *et al.*, 2013; Salinas *et al.*, 2020).

A desregulação insulínica, segundo as recomendações do *Equine Endocrinology Group* (Frank *et al.*, 2020), é diagnosticada por meio de testes dinâmicos, preferencialmente os que realizam o desafio de carboidrato pela via oral, enquanto os testes mais simples de insulina e glicose basal e proxies são menos confiáveis, apesar de mais factíveis a campo pela sua praticidade e menor custo. Outros trabalhos reconhecem o valor dos proxies na avaliação de populações ou de indivíduos ao longo do tempo com fins de acompanhamento clínico ou prevenção (Kronfeld *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2008; Pratt *et al.*, 2009), apesar do coeficiente de variação de alguns deles chegarem a mais de 15% (Pratt *et al.*, 2009).

O IGF-1 é considerado um hormônio antilipolítico e compartilha vias metabólicas comuns com a insulina (Clemmons e Underwood, 1991; Engelking, 2010). Sua relação com obesidade, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica foram estudados em seres humanos (Clemmons e Underwood, 1991; Lukanova *et al.*, 2002), porém carecem de informações na medicina equina.

Na laminite endocrinopática o mecanismo pelo qual a desregulação insulínica causa dano às lâminas dos cascos não é completamente elucidado, porém a hipótese mais aceita e com maiores evidências no momento é a atuação da insulina sobre os receptores de IGF-1 (fator de crescimento similar à insulina-1), um hormônio de crescimento que estimula a mitose e inibe a apoptose celular (Burns e Toribio, 2017; Durham *et al.*, 2019). Com isso, há o alongamento das lâminas e perda da força de adesão das células à membrana basal que garante a estabilidade da terceira falange dentro do casco (Burns e Toribio, 2017).

Outro fator conhecido na perda de arquitetura tecidual decorrente principalmente de processos inflamatórios é o estresse oxidativo (Keshavarzian *et al.*, 2003). Apesar de ser um processo fisiológico presente inclusive durante o exercício, o aumento do metabolismo oxidativo acima da capacidade antioxidante corporal leva a formação de espécies reativas de oxigênio, que danificam lipídios, proteínas e DNA (Sen *et al.*, 2000; Kinnunen *et al.*, 2004; Rivero e Piercy, 2014). Como dito nos capítulos anteriores, sua atuação na laminite endocrinopática ainda não foi estabelecida, porém evidências apontam para sua presença na SME decorrente do desequilíbrio metabólico.

Neste capítulo, os cavalos hípidos da raça Mangalarga Marchador submetidos à dieta hipercalórica divididos em grupos de acordo com o estresse oxidativo/nitrosativo das lâminas dos cascos foram avaliados quanto aos resultados de indicadores de adiposidade, lipídeos, lipoproteínas, indicadores matemáticos e dinâmicos de desregulação insulínica e níveis de IGF-1.

### **3.2 Material e métodos**

#### *Animais e dieta*

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com o número de protocolo 49/2014. Foram utilizados 9 equinos da raça Mangalarga Marchador, 4 machos castrados e 5 fêmeas, com idade média  $\pm$  DP (desvio-padrão) de  $48 \pm 5$  meses, peso médio inicial  $\pm$  DP de  $316 \pm 62,7$  kg e escore de condição corporal (ECC) médio  $\pm$  DP de  $2,9 \pm 1$ .

A dieta hipercalórica foi fornecida e calculada conforme o descrito no capítulo 2. Ao final do período experimental os animais apresentavam peso médio inicial  $\pm$  DP de  $402,77 \pm 58,31$  kg e escore de condição corporal (ECC) médio  $\pm$  DP de  $8,3 \pm 1$ .

#### *Peso, escore corporal, medidas de pescoço e ultrassonografia da base da cauda.*

Os animais tiveram sua altura de cernelha determinada no início do período experimental. Foram pesados em balança, tiveram o escore corporal mensurado sempre pelo mesmo avaliador segundo a escala de Henneke *et al.* (1983) e tiveram a circunferência do pescoço mensurada em três locais, aos 25, 50 e 75% do comprimento total (Frank *et al.*, 2006), no início do experimento e a cada 30 dias.

A ultrassonografia da base da cauda foi realizada nos mesmos momentos, por meio de um aparelho de ultrassom (Echovet®, modelo KX 5100), com transdutor de 5 MHz, posicionado do lado direito da base da cauda, a 5 cm de distância da linha mediana, segundo metodologia descrita por Gentry *et al.* (2004).

#### *Coletas de sangue mensais e análises laboratoriais*

Foram realizadas coletas de sangue por venopunção jugular em tubos com ativador de coágulo, em tubos com EDTA e em tubos com heparina sódica, após 12 horas de jejum alimentar, antes do início da dieta hipercalórica e uma vez ao mês até o término do período experimental. O soro e o plasma foram separados imediatamente após as coletas e congelados a  $-18^{\circ}$  C até a análise laboratorial.

O soro foi submetido a análise pelo sistema de identificação espectrofotométrica em analisador bioquímico automatizado (COBAS MIRAGE-ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEM®) com a utilização de Kits comerciais específicos (Labtest®). A frutossamina foi determinada seguindo a técnica colorimétrica (Redução do NBT - azul de nitrotetrazóico, ref. 97). As diferentes frações do colesterol e a avaliação da concentração total de lipídios foi realizada usando o método de Lowry *et al.* (1951). Métodos colorimétricos foram empregados para a mensuração de colesterol total (Enzimático de Trinder, ref. 76), HDL-c (precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, ref. 13), LDL-c (surfactante seletivo, ref. 111) e triglicérides (reação de Trinder, ref. 87). 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 de glicose foram utilizadas as amostras de plasma obtidas dos tubos com heparina sódica e separadas logo após a coleta. 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). Mensurações de IGF-1 foram realizadas por meio de quimioluminescência, por meio do kit Immulite 2000 IGF-1 (Euro/DPC Ltd.) no equipamento Immulite 2000 (Siemens®), utilizando-se do soro previamente separado e congelado.

#### *O teste dinâmico de baixa dose de glicose oral (TBDGO) e proxies*

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 dextrose (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 (Ralston, 2002).

Também foram calculadas as áreas totais abaixo da curva, 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 e de insulina obtidos no TBDGO (Correa *et al.*, 2007).

Os proxies HOMA-IR, MIRG, RISQI, G:I e QUICKI foram calculados, conforme a metodologia descrita no capítulo 1, utilizando os valores de glicose e insulina em jejum obtidos das amostras coletadas a cada 30 dias.

### *Marcação imuno-histoquímica para superóxido-dismutase (SOD2) e nitrotirosina*

Conforme descrito no capítulo 2, foram realizadas biópsias de casco antes e após o período experimental e imunohistoquímica para marcação de superóxido dismutase e nitrotirosina. Dos 9 animais avaliados, 4 apresentaram marcação para nitrotirosina após 150 dias da dieta experimental. As demais amostras não apresentaram marcações para estresse oxidativo, tanto as testadas para nitrotirosina do início do período experimental quanto as testadas para SOD2 em ambos os momentos. Sendo assim os animais foram separados apenas em dois grupos, NIT+ e NIT-, para a realização das análises estatísticas.

### *Análise estatística*

Os animais foram separados em grupos com (NIT+) ou sem (NIT-) marcação para nitrotirosina. Cada variável avaliada foi submetida ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os grupos NIT+ e NIT- foram comparados entre si por teste T em cada momento avaliado, separadamente. A variação de cada parâmetro dentro de cada grupo ao longo dos meses foi calculada por One Way ANOVA com pós teste de Newman Keuls para comparação da variação entre os momentos. Foi realizada análise de correlação entre o IGF-1 e os demais parâmetros dentro dos grupos NIT+ e NIT-. Os parâmetros que passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk foram analisados por correlação de Pearson e os demais por correlação de Spearman. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 8<sup>®</sup>, sendo considerada diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

## **3.3 Resultados**

### *Mensurações morfométricas e ultrassonografia da base da cauda*

A média de altura de cernelha dos animais foi significativamente diferentes ( $p = 0,0018$ ) entre os grupos NIT+ e NIT-, sendo as respectivas médias $\pm$ DP iguais a  $137 \pm 3,7$  cm e  $151 \pm 4,6$  cm. As alturas mínima e máxima de NIT+ foram 132 e 140cm, e de NIT- 147 e 158cm, respectivamente. As variáveis peso, escore, ultrassonografia da base da cauda e medidas do pescoço aos 25, 50 e 75% do seu comprimento (figura 3.1) tiveram aumento das médias ao longo dos meses em ambos os grupos. No entanto, o grupo NIT+ apresentou médias inferiores nas mensurações basais de peso e escore e sofreu um aumento mais acentuado das médias comparado ao grupo NIT-.

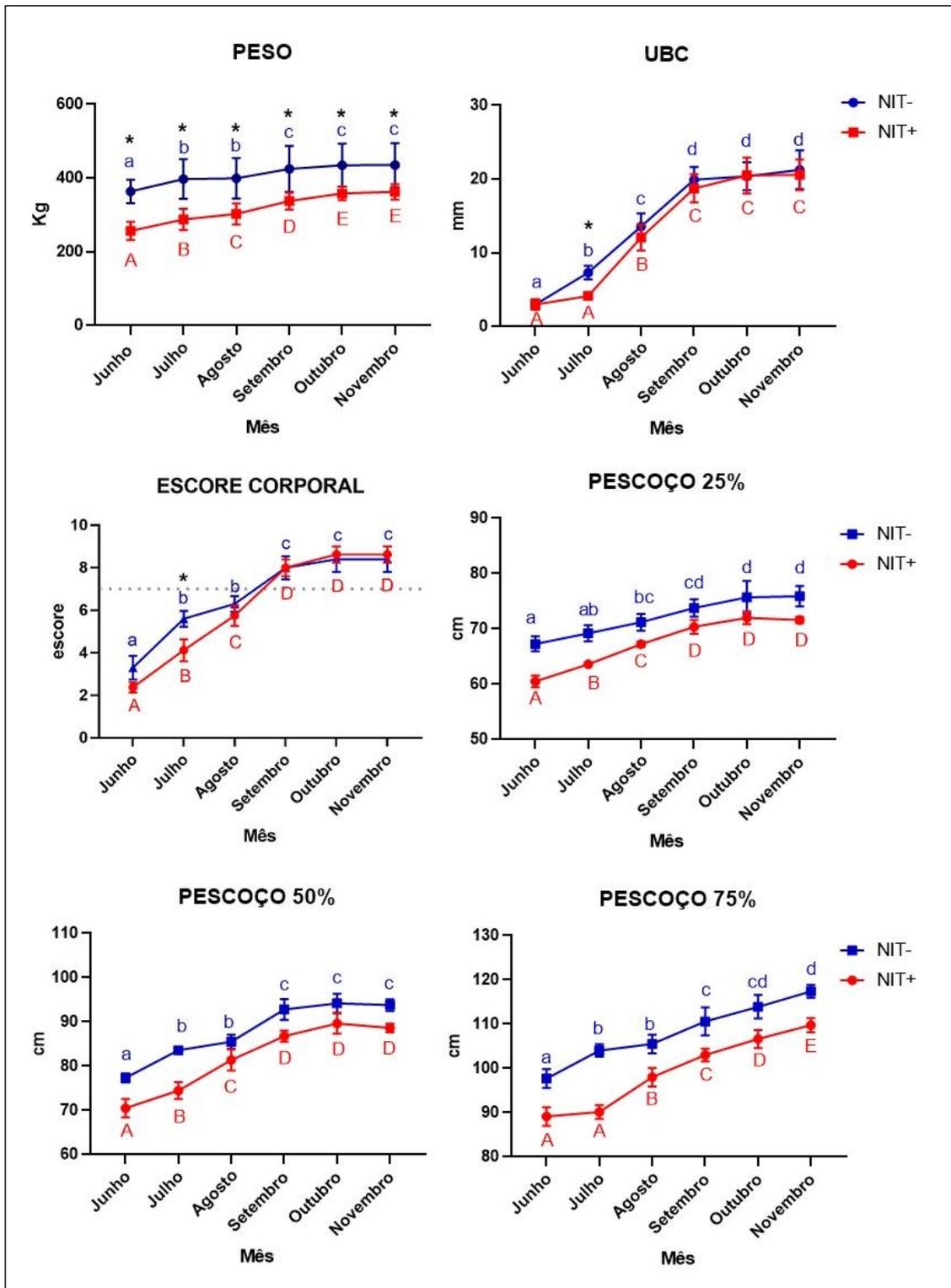


Figura 3.1. Gráficos com médias e erro padrão de variáveis morfométricas de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar.

Variáveis (de cima para baixo, da esquerda para a direita): peso, ultrassonografia da base da cauda (UBC), escore corporal e circunferências do pescoço nos locais correspondentes aos 25% (Pescoço 25), 50% (Pescoço 50) e 75% (Pescoço 75) do comprimento. A linha pontilhada horizontal no gráfico de escore corresponde ao escore 7, a partir do qual há maior risco de laminite endocrinopática (Durham, 2017). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ).

#### *Lípides, lipoproteínas, glicose e insulina em jejum*

O colesterol não apresentou diferença entre os grupos NIT+ e NIT-. Mas, enquanto o grupo NIT- não teve variação ao longo dos meses, o grupo NIT+ teve variação de valores significativamente do mês de junho comparado a todos os demais meses. Comportamento similar é observado nas frações HDL e LDL, tendo, este último, diferença significativa entre os grupos NIT+ e NIT- no mês de junho (NIT-:  $20,93 \pm 5,08$  e NIT+:  $12,90 \pm 2,99$ ), como mostra a figura 3.2. A fração VLDL não apresentou variação significativa de valores ao longo dos meses.

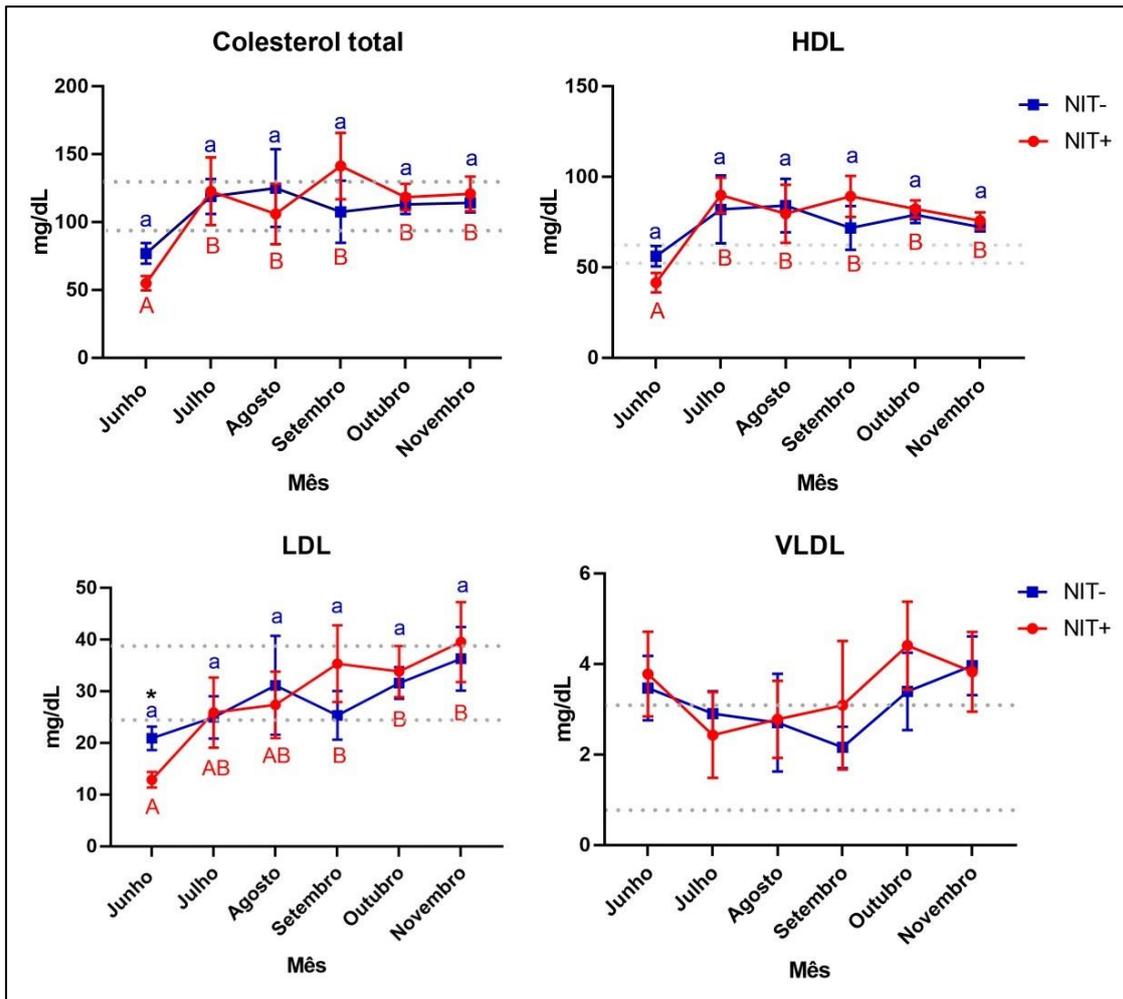


Figura 3.2. Gráficos com médias e erro padrão do colesterol total e frações HDL, LDL e VLDL de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais nos gráficos se referem aos valores de referência do colesterol (Kaneko *et al.*, 1997) e frações (Yamamoto *et al.*, 1979). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ).

Os triglicérides, ácidos graxos livres e frutossamina não apresentaram diferença entre grupos, e não apresentaram diferença ao longo dos meses dentro de cada grupo, como ilustra a figura 3.3.

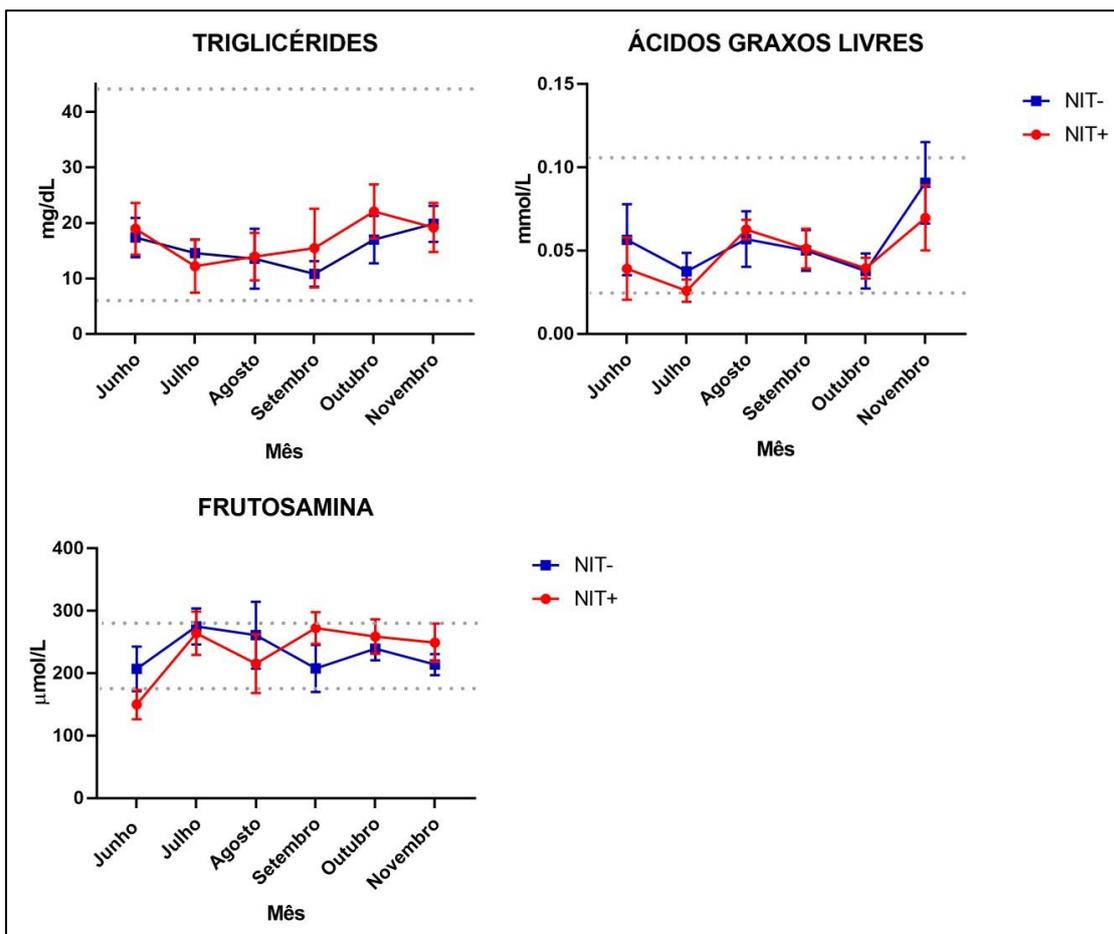


Figura 3.3. Gráficos com médias e erro padrão dos triglicérides, ácidos graxos livres e frutosamina de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais nos gráficos se referem aos valores de referência de acordo com Kaneko *et al.* (1997). Não houve diferenças entre grupos ou tempos em nenhum destes analitos ( $p < 0,05$ ).

A insulina em jejum (média  $\pm$  DP) apresentou diferença entre os grupos apenas no tempo basal, com o grupo NIT- ( $8,25 \pm 2,66 \mu\text{U/mL}$ ) com média significativamente superior ao NIT+ ( $2,90 \pm 0,45 \mu\text{U/mL}$ ). No entanto, enquanto o grupo NIT- manteve a média entre tempos sem variação estatística, o grupo NIT+ obteve diferenças significativas comparando-se o mês de junho com os meses de setembro, outubro e novembro. A glicemia em jejum não apresentou diferença entre grupos. Dentro do grupo NIT- houve diferença de junho para julho e novembro, de julho para agosto, setembro, outubro e novembro e de outubro para novembro. No grupo NIT+ houve diferença apenas de julho para novembro e de outubro para novembro (figura 3.4).

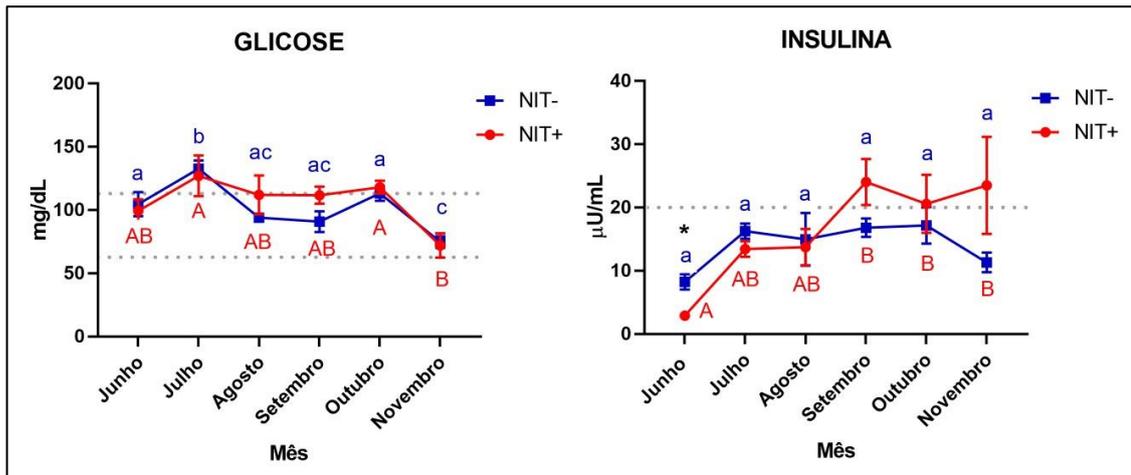


Figura 3.4. Gráficos com médias e erro padrão da glicemia e insulinemia em jejum de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais nos gráficos se referem aos valores de referência de glicose (Kaneko *et al.*, 1997) e limite de insulina a partir do qual há suspeita de desregulação insulínica (Frank *et al.*, 2020). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ).

#### *Proxies e curvas de glicose e insulina*

A relação G:I apresenta diferença significativa entre os grupos em junho (NIT-:  $13,97 \pm 5,93$  e NIT+:  $34,02 \pm 2,89$ ) e novembro (NIT-:  $7,69 \pm 1,95$  e NIT+:  $3,89 \pm 1,91$ ), e ao analisar as diferenças entre tempos dentro dos grupos, há diferença significativa entre junho e os demais meses nos dois grupos, porém em NIT+ a diferença também está presente entre os meses de julho e novembro (figura 3.5).

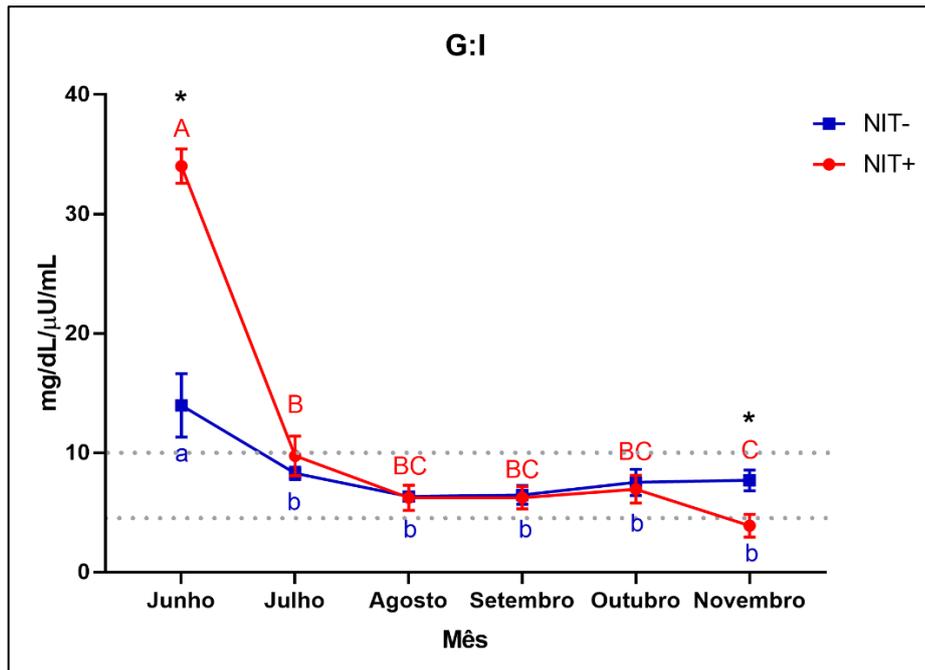


Figura 3.5. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis da razão glicose/insulina (G:I) de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais no gráfico se referem aos limites de sensibilidade insulínica normal (acima de 10), resistência insulínica compensada (10 a 4,5) e resistência insulínica descompensada (abaixo de 4,5) (Frank, 2011). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ).

O proxie RISQI apresenta valores significativamente diferentes entre os grupos NIT- ( $0,360 \pm 0,065$ ) e NIT+ ( $0,5875 \pm 0,051$ ) no mês de junho. Na avaliação entre os meses dentro de cada grupo, há variação significativa entre junho e os demais meses em ambos os grupos, porém em NIT- há aumento novamente nos valores, fazendo com que os valores dos meses de junho e novembro não tenham variação estatística entre eles, o que não acontece com os valores de NIT+ ao final (figura 3.6).

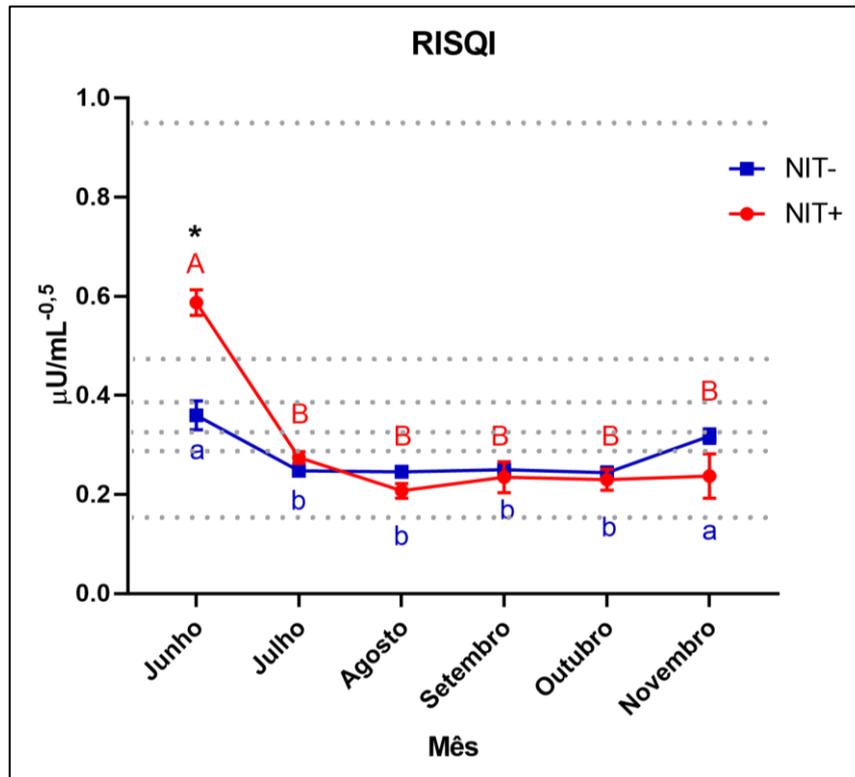


Figura 3.6. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis do *proxie* RISQI de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais no gráfico se referem aos limites dos quinteis segundo Treiber *et al.* (2005). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ).

O *proxie* MIRG teve diferença significativa entre os grupos nos meses de junho (NIT-:  $3,92 \pm 1,34$  e NIT+:  $2,01 \pm 0,36$ ) e novembro (NIT-:  $7,64 \pm 3,00$  e NIT+:  $13,11 \pm 2,34$ ), sendo que em junho os valores em NIT+ foram significativamente menores e, em novembro, significativamente maiores. Quanto às comparações por tempo dentro dos grupos, em NIT- houve diferença entre os meses de junho e julho comparados a novembro. No grupo NIT+ houve diferença entre todos os meses comparados a junho e novembro (figura 3.7).

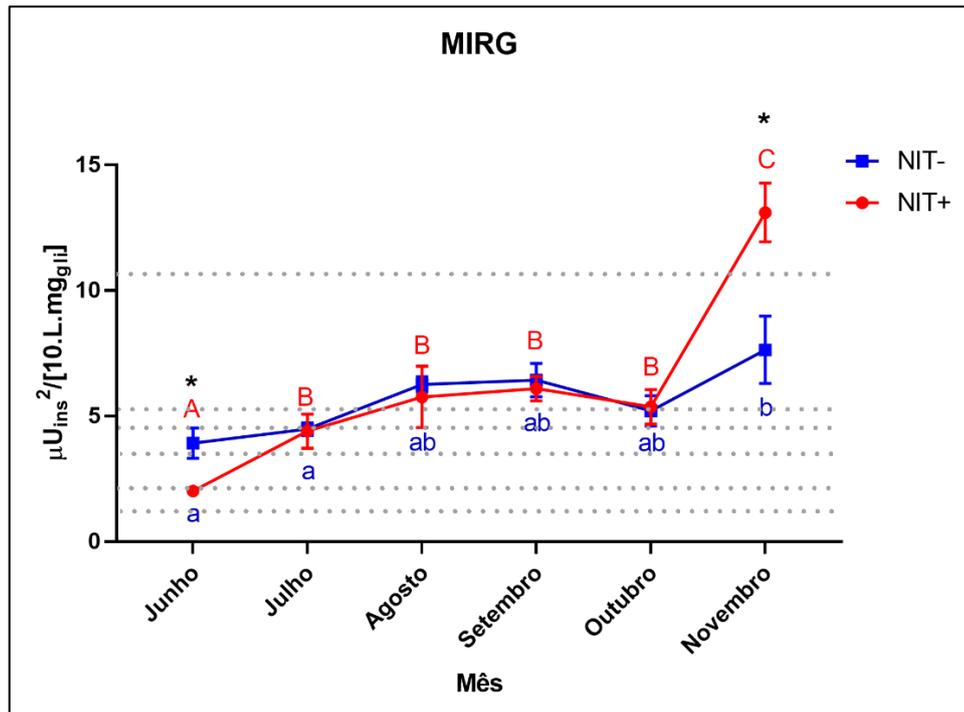


Figura 3.7. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis do *proxie* MIRG de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais no gráfico se referem aos limites dos quinteis segundo Treiber *et al.* (2005). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ).

O *proxie* HOMA-IR apresentou diferença significativa entre os grupos NIT+ e NIT- nos meses de junho (NIT-:  $2,12 \pm 0,76$  e NIT+:  $0,72 \pm 0,23$ ) e agosto (NIT-:  $4,43 \pm 1,33$  e NIT+:  $8,02 \pm 1,74$ ). Na avaliação estatística entre tempos dentro de cada grupo, o grupo NIT- teve um aumento significativo da média entre junho e julho, porém houve nova redução ao final do período experimental, sem diferença com os valores basais, o que não ocorreu com o grupo NIT+. No grupo NIT+ houve diferença entre o mês de junho comparado a todos os meses subsequentes (figura 3.8).

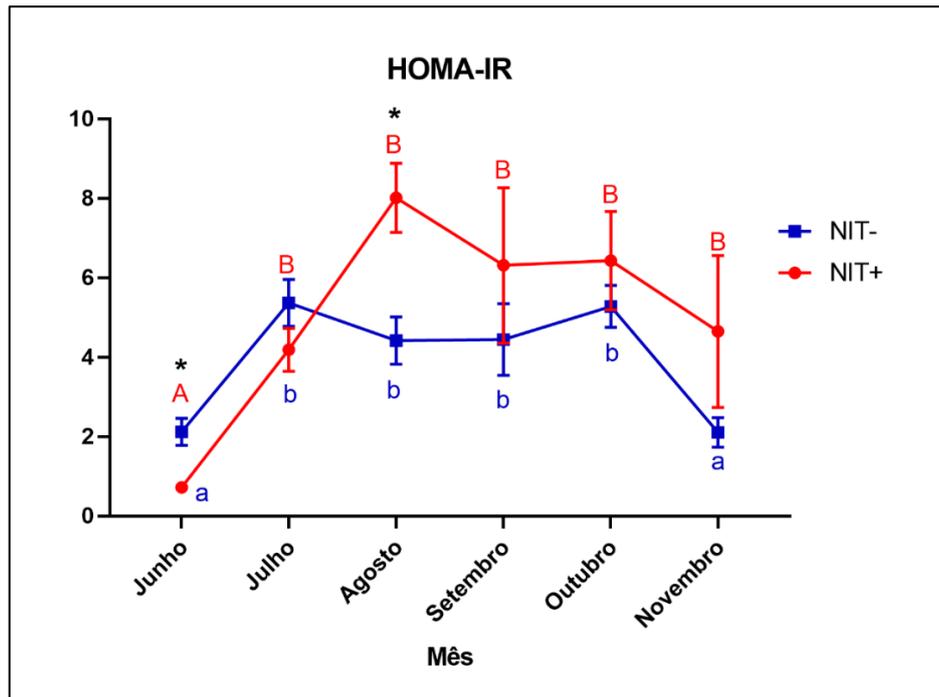


Figura 3.8. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis do *proxie* HOMA-IR de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ).

O *proxie* QUICKI apresentou diferença entre grupos apenas no mês de junho, com maior média no grupo NIT+ ( $0,4091 \pm 0,0246$  e NIT-:  $0,3448 \pm 0,0219$ ). Houve diferença ao longo dos meses em ambos os grupos, sendo que o grupo NIT- apresenta uma forma de curva, onde a média de junho não difere da de novembro, enquanto o grupo NIT+ apresentou redução da média em julho, o que se manteve até o final do período experimental, conforme mostra a figura 3.9.

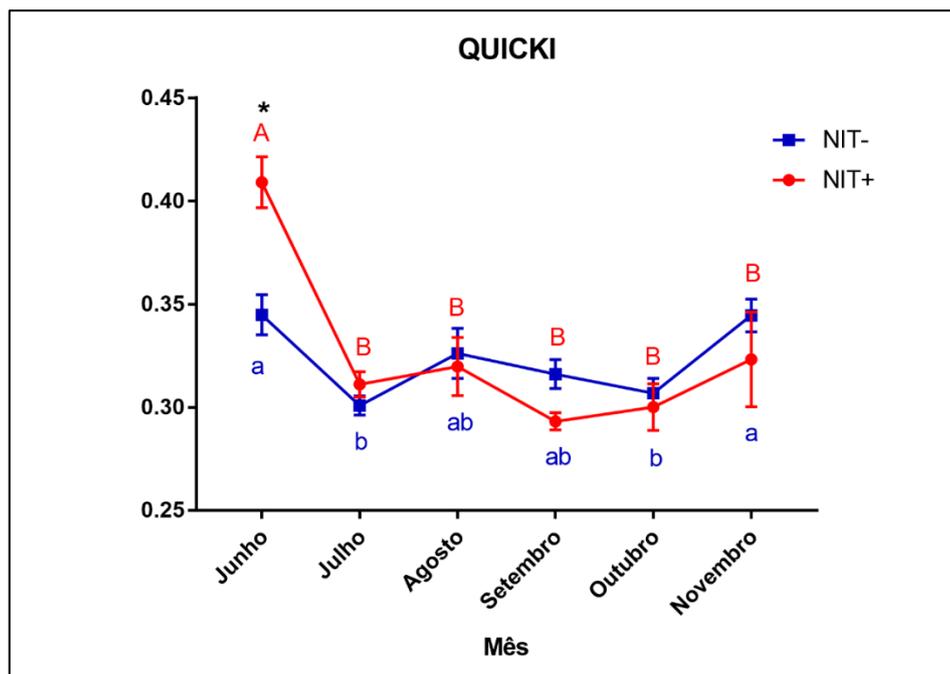


Figura 3.9. Gráfico com médias e erro padrão dos níveis do *proxie* QUICKI de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+), asteriscos mostram diferença pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ).

#### *Curvas de Glicose*

Não houve diferença entre os grupos NIT+ e NIT- em nenhum dos tempos. Dentro do grupo NIT+ houve diferença das curvas entre os meses de junho e agosto e entre agosto e novembro, enquanto no grupo NIT- houve diferença entre todos os meses (figura 3.10).

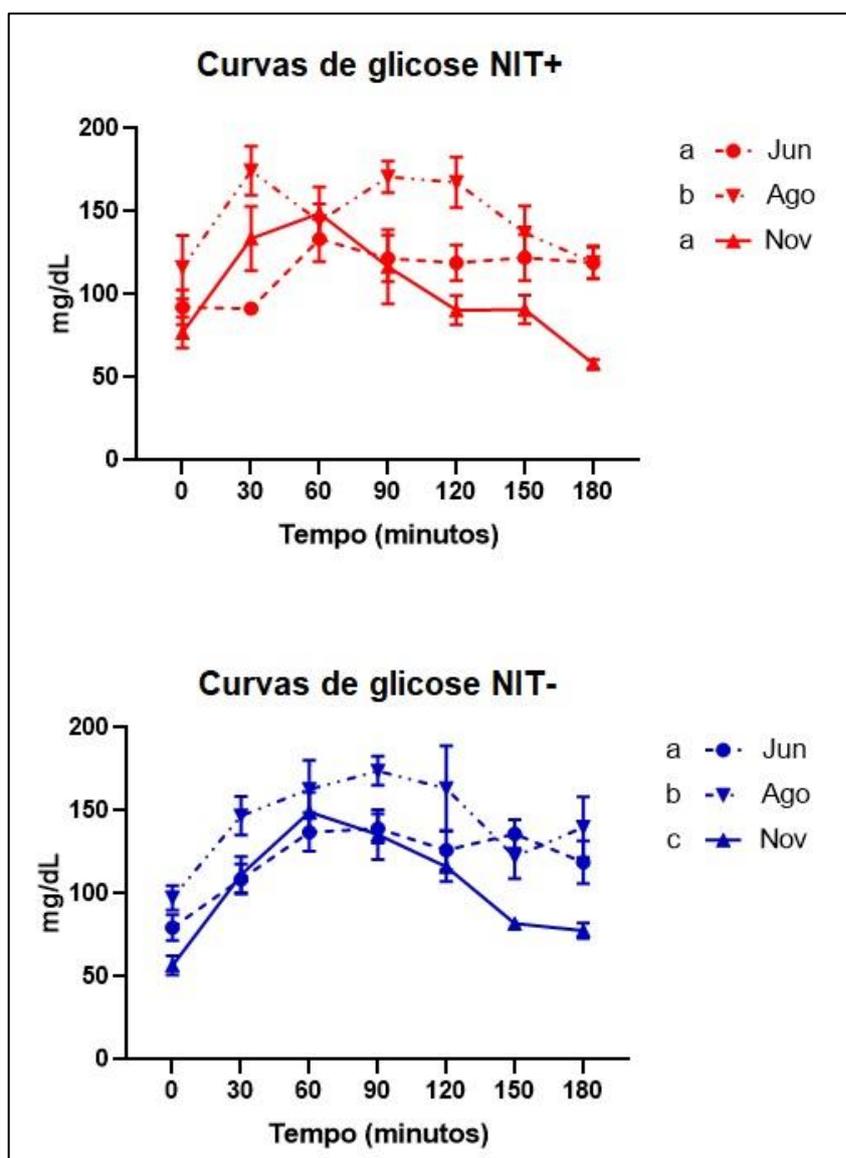


Figura 3.10. Gráficos com médias e erro padrão das curvas de glicose resultantes do teste de baixa dose de glicose oral (TBDGO) de cavalos Mangalarga Marchador após 0 (junho), 90 (agosto) e 150 (novembro) dias de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos ( $p < 0,05$ ).

### *Curvas de insulina*

Houve diferença entre os grupos no mês de junho nos tempos 60 (NIT-:  $21,77 \pm 15,29$  e NIT+:  $10,32 \pm 5,23$ ) e 90 (NIT-:  $24,99 \pm 17,51$  e NIT+:  $12,34 \pm 2,89$ ), e no mês de novembro no tempo 60 (NIT-:  $38,76 \pm 6,74$  e NIT+:  $64,43 \pm 26,72$ ). Dentro do grupo NIT- houve diferenças das

curvas entre o mês de junho comparado a agosto e novembro. Dentro do grupo NIT+ houve diferença entre as curvas dos 3 meses: junho, agosto e novembro (figura 3.11).

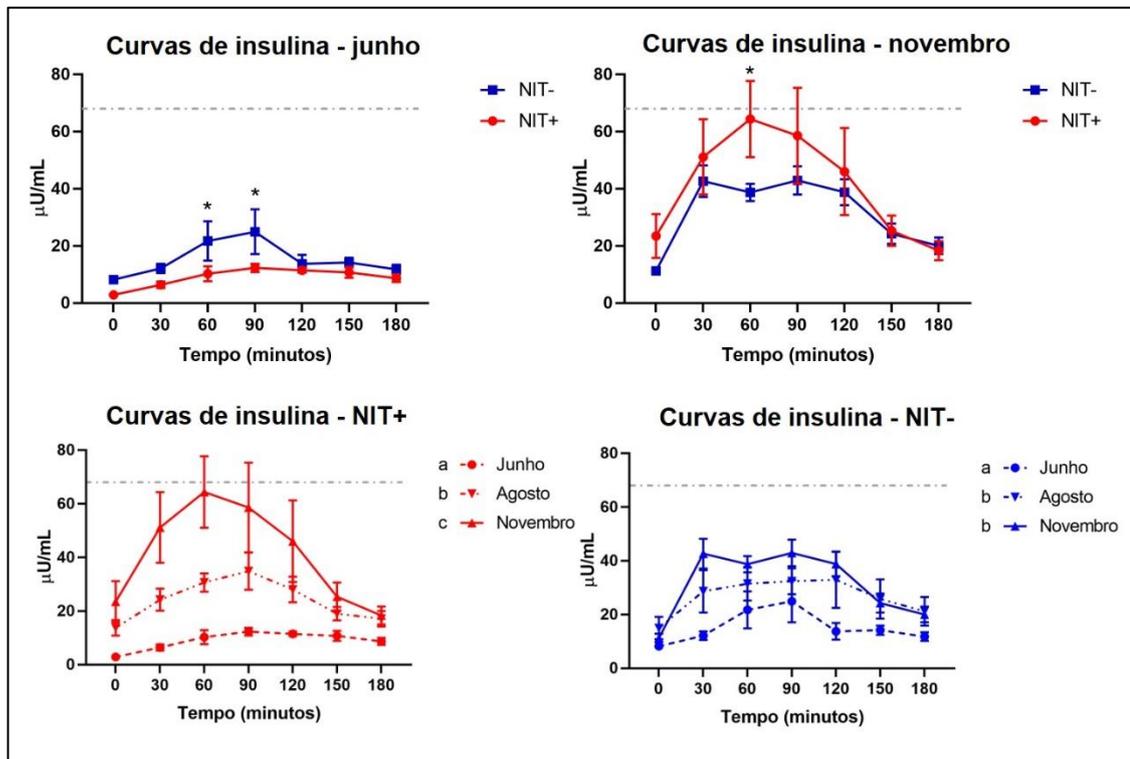


Figura 3.11 Gráficos com médias e erro padrão das curvas de insulina resultantes do teste de baixa dose de glicose oral (TBDGO) de cavalos Mangalarga Marchador após 0 (junho), 90 (agosto) e 150 (novembro) dias de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. A linha pontilhada representa o limite máximo do pico de insulina em animais sem desregulação insulínica (Durham et al., 2019). Asteriscos sinalizam diferença entre os grupos NIT+ e NIT- pelo teste T, letras diferentes nas legendas mostram diferença entre as curvas pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos ( $p < 0,05$ ).

#### *Área sob a curva glicose*

Não houve diferença entre os grupos NIT+ e NIT-. O grupo NIT- apresentou diferença significativa entre os 3 meses, enquanto o NIT+ apresentou diferença apenas entre junho e agosto, e agosto e novembro, mas não houve diferença entre junho e novembro (figura 3.12).

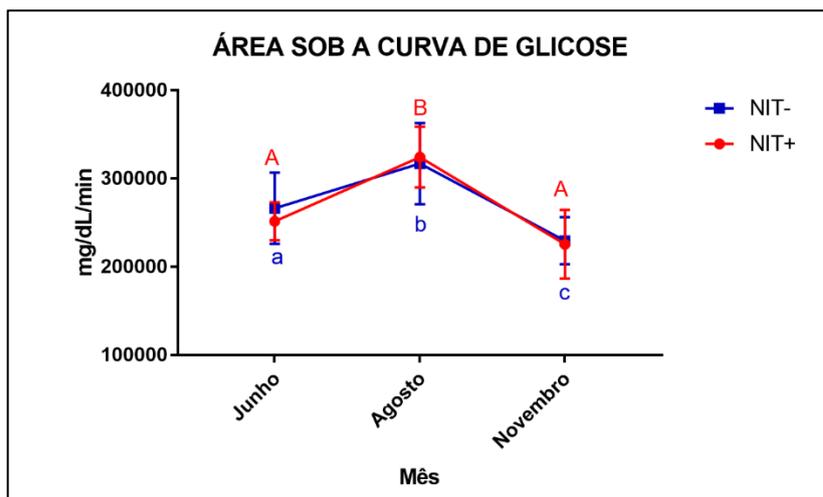


Figura 3.12. Gráficos com médias e erro padrão das áreas sob a curva de glicose resultantes do teste de baixa dose de glicose oral (TBDGO) de cavalos Mangalarga Marchador após 0 (junho), 90 (agosto) e 150 (novembro) dias de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+) ( $p < 0,05$ ).

#### *Área sob a curva insulina*

Houve diferença entre os grupos na área sob a curva do mês de junho (NIT-:  $33711 \pm 10346$  e NIT+:  $19839 \pm 3048$ ). Não houve diferença entre tempos no grupo NIT-, e no grupo NIT+ houve diferença entre os meses de junho e novembro, e agosto e novembro (figura 3.13).

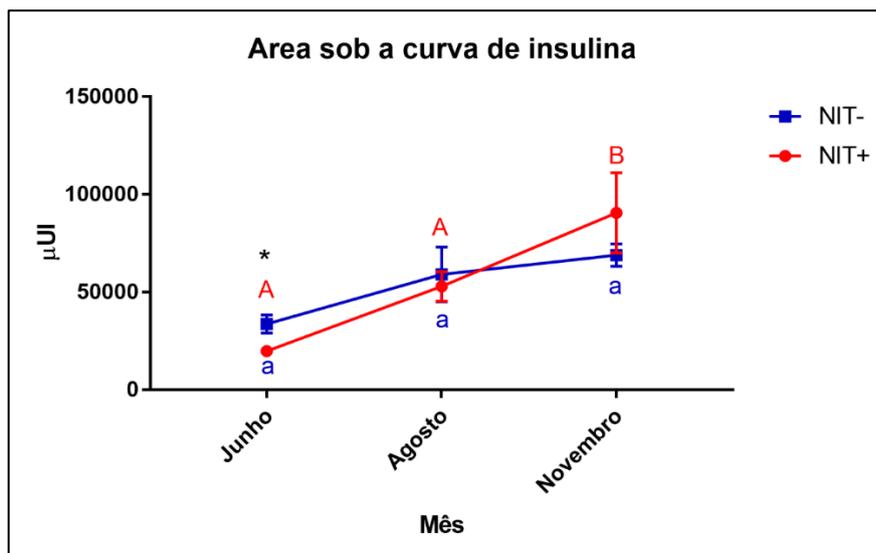


Figura 3.13. Gráficos com médias e erro padrão das áreas sob a curva de insulina resultantes do teste de baixa dose de glicose oral (TBDGO) de cavalos Mangalarga Marchador após 0 (junho), 90 (agosto) e 150 (novembro) dias de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Asteriscos mostram diferença entre os grupos NIT+ e NIT- no referido mês pelo teste T, e letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+) ( $p < 0,05$ ).

### *IGF-1*

O IGF-1 não apresentou diferença entre os grupos NIT+ e NIT-, porém apresentou diferença entre tempos apenas dentro do grupo NIT+, conforme ilustra a figura 3.14.

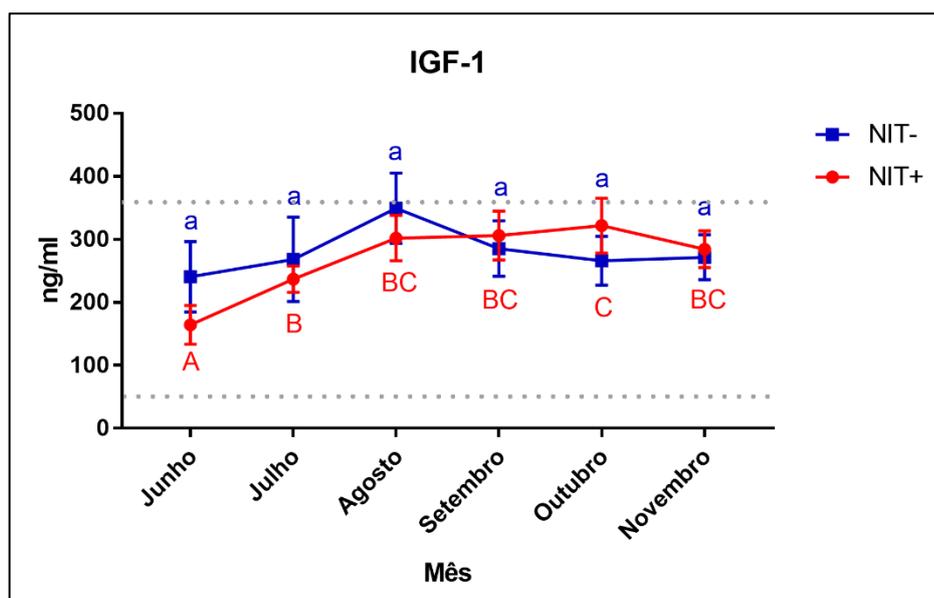


Figura 3.14. Gráficos com médias e erro padrão dos níveis séricos de IGF-1 livre de cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica. O grupo NIT+ corresponde a 4 animais que apresentaram marcação para 3-nitrotirosina lamelar após 5 meses de dieta hipercalórica e o grupo NIT- corresponde a 5 animais que não apresentaram marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. As linhas pontilhadas horizontais nos gráficos se referem aos valores de referência de IGF-1 existentes para pôneis (Köller *et al.*, 2016). Letras diferentes mostram diferença ao longo dos meses pelo teste de Newman-Keuls dentro dos grupos (minúsculas para o NIT- e maiúsculas para o NIT+) ( $p < 0,05$ ).

No grupo NIT-, o IGF-1 apresentou correlação negativa com o peso, e correlação positiva com a circunferência de pescoço aos 25% do comprimento, o colesterol total, as frações HDL e LDL, os ácidos graxos livres. No grupo NIT+ apresentou correlação positiva com o escore corporal, o escore de pescoço, a ultrassonografia da base da cauda, a circunferência de pescoço aos 25% do comprimento, o colesterol total e suas frações, e triglicerídeos. Houve correlação negativa do IGF-1 com o proxie QUICKI e correlação positiva com a área sob a curva de insulina no grupo NIT+, mas não no grupo NIT-. A tabela 3.1 mostra os valores de  $r$  (pela correlação de Pearson ou Spearman) e o valor de  $p$  das variáveis que apresentaram correlação significativa em pelo menos um dos grupos.

Tabela 3.1. Valores de  $r$  (Pearson ou Spearman) e  $p$  da correlação entre o IGF-1 sérico e as variáveis morfométricas e indicadores laboratoriais de desregulação insulínica de cavalos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses com estresse oxidativo/nitrosativo lamelar (NIT+) e sem

estresse oxidativo/nitrosativo lamelar (NIT-). UBC: ultrassonografia da base da cauda; pescoço 25: circunferência do pescoço aos 25% do seu comprimento; AUCins: área sob a curva de insulina.

<b>Variável correlacionada ao IGF-1</b>	<b>Grupo NIT-</b>		<b>Grupo NIT+</b>	
	<b>r</b>	<b>p</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>Peso</b>	-0,6351	0,0002	0,2529	0,2561
<b>Escore corporal</b>	0,0004	0,9981	0,4833	0,0227
<b>Escore de pescoço</b>	0,1517	0,4235	0,5497	0,0080
<b>Pescoço 25%</b>	0,3925	0,0319	0,4333	0,0440
<b>UBC</b>	0,05968	0,7541	0,4532	0,0341
<b>Triglicérides</b>	0,2809	0,1327	0,5082	0,0157
<b>Ácidos graxos livres</b>	0,4122	0,0236	0,3268	0,1377
<b>Colesterol</b>	0,4185	0,0214	0,5598	0,0067
<b>HDL</b>	0,4668	0,0093	0,439	0,0409
<b>LDL</b>	0,5075	0,0042	0,7221	0,0001
<b>VLDL</b>	0,2809	0,1327	0,5083	0,0157
<b>QUICKI</b>	0,3106	0,2598	-0,6583	0,0277
<b>AUCins</b>	0,2393	0,3892	0,6697	0,0280

### 3.4 Discussão

Vários estudos demonstraram íntima relação entre adiposidade regional e parâmetros indicativos de DI (Frank *et al.*, 2006; Vick *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2009; Pleasant *et al.*, 2013). No entanto, outros trabalhos evidenciaram que equinos obesos apresentam menor atividade antioxidante sanguínea (Pleasant *et al.*, 2013) e aumento do estresse oxidativo de neutrófilos circulantes, mesmo sem DI (Salinas *et al.*, 2020), reforçando que a obesidade,

independente da SME, causa um estado pró-inflamatório. Considerando que os animais do presente estudo não apresentaram diferença de escore corporal entre grupos, com animais mais pesados, inclusive, no grupo NIT-, o estresse oxidativo/nitrosativo lamelar pode ser um marcador mais específico dos desequilíbrios orgânicos causados pela SME. Outra observação interessante é que no presente estudo, apesar de não haver diferença significativa dos escores dos animais entre os grupos, foi possível observar um ganho de peso acelerado no grupo NIT+. Visto que todos os animais estavam submetidos às mesmas condições de dieta e exercício físico, este achado sugere que os animais NIT+, além de mais sensíveis ao estresse oxidativo/nitrosativo lamelar, apresentavam uma facilidade acentuada em atingir obesidade comparados aos NIT-. A altura dos animais de raças nacionais, como os indivíduos do presente estudo, está próxima da altura de pôneis perante a Fédération Équestre Internationale, por exemplo, que atualmente considera como limítrofe a altura de 148 cm (FEI, 2019). Considerando este padrão, o grupo NIT+ é formado apenas por pôneis, enquanto o NIT- teria cavalos e pôneis em sua composição, e, talvez por este motivo, os indivíduos de NIT+ ganharam peso (“easy keepers”) de forma acentuada.

Ao longo dos meses os animais do grupo NIT+ apresentaram aumento do colesterol total e das frações HDL e LDL, o que não foi observado no grupo NIT-. Os achados do trabalho de Frank *et al.* (2006) se aproximam dos presentes resultados, onde os autores relataram aumento das frações HDL e VLDL em cavalos obesos com resistência insulínica, mas sem aumento de triglicérides ou colesterol total. No presente estudo não houve alteração ao longo dos meses nos níveis de triglicérides ao longo dos meses ou entre os grupos, o que discorda com outros trabalhos que encontraram relação entre hipertrigliceridemia e obesidade (Pleasant *et al.*, 2013) e resistência insulínica (Treiber *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2014). Elzinga *et al.* (2016), relataram triglicérides e ácidos graxos não esterificados elevados em cavalos com SME comparados a animais controle, o que discorda dos presentes achados visto que não houve aumento de nenhum destes analitos ao longo dos meses ou entre grupos. Também em contraposição com o presente estudo, Valle *et al.* (2013) observaram aumento da trigliceridemia e do marcador de estresse oxidativo plasmático pentosidina em pôneis com SME. Ao contrário do que acontece da síndrome metabólica em humanos, os equinos não desenvolvem aterosclerose decorrente da dislipidemia, mesmo aqueles que chegam a idades tão avançadas quanto 50 anos (Ertelt *et al.*, 2014). O colesterol nos equinos é predominantemente HDL, o que pode ser um dos fatores protetores às doenças cardiovasculares decorrentes da síndrome

metabólica (Frank, 2011; Ertelt *et al.*, 2014). Considerando os resultados conflitantes na literatura, a dislipidemia não é um achado constante na SME e não pode ser considerada um método diagnóstico (Durward-Arkurst *et al.*, 2019; Durham *et al.*, 2019). Porém o número limitado de animais e o período consideravelmente curto de dieta e aquisição de adiposidade regional talvez não tenham permitido que alterações mais evidentes nos lípides fossem identificados.

A frutosamina, usada como um marcador de glicosilação de proteínas e hiperglicemia crônica (Pattullo e Kidney, 2014), não apresentou diferença entre grupos ou ao longo dos meses. Em equinos, a frutosamina é elevada em animais com laminite endocrinopática ativa, porém falha em identificar animais com disfunção da pars média e pituitária ou desregulação insulínica sem sinais clínicos de laminite (Knowles *et al.*, 2012; Knowles *et al.*, 2014), o que concorda com os resultados. No estudo original (Ribeiro, 2017), houve aumento estatístico entre a média de frutosamina inicial e a mensurada nos dois meses seguintes. Porém, nos meses subsequentes não houve diferenças.

Os valores de insulina em jejum do grupo NIT+ aumentaram significativamente a partir do quarto mês, o que não aconteceu no grupo negativo, demonstrando a desregulação insulínica nesse grupo. Os resultados do teste dinâmico de insulina, após ingestão de glicose, corroboram este achado na comparação entre grupos tanto na observação das curvas de insulina, como também na análise estatística da área abaixo da curva. O aumento da insulinemia observado como resultado ao TBDGO pode estar alinhado tanto com a redução da sensibilidade insulínica quanto com a resposta insulinêmica pós-prandial elevada observada em animais submetidos a dietas com alto teor de carboidratos (Bamford *et al.*, 2016; Jacob *et al.*, 2018; Durham *et al.*, 2019), o que não deixa de ser alarmante, visto que o excesso de insulina parece estar intimamente envolvido na fisiopatologia da laminite endocrinopática (Burns e Toribio, 2017; Jacob *et al.*, 2018; Durham *et al.*, 2019). Além disso, em várias espécies foi demonstrado que a insulina está envolvida na ativação de neutrófilos, ativando a quimiotaxia e estimulando a atividade de explosão oxidativa (*oxidative burst*) neutrofílica (Safranova *et al.*, 2001; Okouchi *et al.*, 2002; Walrand *et al.*, 2004; Walrand *et al.*, 2006; Holbrook *et al.*, 2012), o que poderia justificar os maiores valores insulinêmicos encontrados no grupo NIT+.

Apesar das diferenças do comportamento da insulina entre os grupos, o comportamento da glicemia basal foi muito semelhante entre os grupos (fig. 3.4), aumentando nos meses iniciais e reduzindo em novembro. A glicose a partir de 150 mg/dl caracteriza diabetes associada à SME (Durward-Arkurst *et al.*, 2019), o que não foi observado nos animais ao longo do estudo. Nos testes dinâmicos, a área sob a curva de glicose obtida pelo TBDGO aumentou aos 90 dias seguido pela redução aos 150 dias em ambos os grupos, o que seria um indicativo de que a insulina teria o mesmo comportamento, no entanto a área sob a curva de insulina do grupo NIT+ aumentou ainda mais aos 150 dias, mostrando que a secreção insulínica aumentou ou seu clearance reduziu, enquanto a glicose se manteve relativamente estável, o que poderia ser interpretado como uma redução da sensibilidade à insulina, visto que uma maior quantidade de insulina foi necessária para manter a glicose normal (Kahn, 1978), no entanto, como não foram realizados testes de administração intravenosos de glicose para eliminar o efeito das incretinas na insulinemia, não podemos afirmar que houve uma redução da sensibilidade insulínica periférica. Jacob *et al.* (2018) relataram aumento da insulinemia e aumento da sensibilidade à insulina em animais não obesos submetidos a dieta com altas concentrações de carboidratos por 7 semanas, enquanto Bamford *et al.* (2016) relataram redução da sensibilidade à insulina e aumento da resposta insulínica aguda à glicose em cavalos com obesidade induzida submetidos a dieta com alto teor de carboidratos por 20 semanas, mas não em animais obesos submetidos a dieta com alto teor de gordura.

Considerando os valores de referência segundo Frank (2011), na relação G:I, ambos os grupos apresentaram sensibilidade insulínica normal inicialmente, com médias acima de 10. Ao longo dos meses ambos os grupos reduziram suas médias para valores entre 4,5 e 10, refletindo resistência insulínica compensada, e, ao final, o grupo NIT+ alcançou uma média de 3,890, indicativo de resistência insulínica descompensada (Frank, 2011), enquanto o grupo NIT- permaneceu com uma média de 7,692. Na literatura médica a razão glicose-insulina é utilizada na avaliação da resistência à insulina em mulheres com ovários policísticos (Legro *et al.*, 1998; Ducluzeau *et al.*, 2003). Em animais, há relatos da razão G:I apresentar correlação negativa com o escore corporal e a idade em equinos (Pratt-Phillips *et al.*, 2010) e correlação negativa com o escore corporal e positiva com ciclicidade ovariana em elefantes (Morfeld e Brown, 2017), reforçando sua utilidade na avaliação da desregulação insulínica, especialmente quando são realizadas coletas repetidas (Pratt *et al.*, 2009).

O proxie RISQI apresenta no mês de junho valores médios do grupo NIT- dentro do quintile 3, enquanto os do grupo NIT+ estão dentro do quintile 5 (Treiber *et al.*, 2005), o que indicaria uma sensibilidade à insulina superior do grupo NIT+ neste momento. Entre os meses de julho e outubro, ambos os grupos permaneceram com valores médios de RISQI dentro do quintile 1, porém, no mês de novembro, a média de NIT+ ficou no quintile 1 (3 animais no quintile 1 e um animal no quintile 3), enquanto a média de valores do grupo NIT- foi para o quintile 2 (3 animais no quintile 2, um animal no quintile 3 e um animal no um). Observando a variação ocorrida ao longo dos meses de acordo com os quintiles definidos por Treiber *et al.* (2005), ambos os grupos de animais sofreram uma redução na sensibilidade à insulina ao serem submetidos à dieta hipercalórica. Porém, ao final o grupo NIT+ apresentou pior sensibilidade à insulina que o grupo NIT-. Borer *et al.* (2012) relataram que os proxies RISQI e QUICKI foram capazes de distinguir pôneis com e sem histórico de laminite, apesar não terem sido acurados quanto aos valores de referência pré-estabelecidos. Considerando que no presente estudo os animais não apresentaram sinais clínicos de laminite, as mensurações repetidas podem ter refletido a fase de desenvolvimento de desregulação insulínica.

O proxie MIRG apresentou valores basais em NIT- que se encaixam no quintile 3 (2 animais no quintile 2, e um animal em cada um dos quintiles: 3, 4 e 5), enquanto o NIT+ está dentro do quintile 1 (2 animais no quintile 2, 2 animais no quintile 1), mostrando que ambos os grupos inicialmente tinham baixa resposta insulínica aguda à glicose, porém o grupo NIT+ tinha a menor resposta. Ao longo dos meses ambos os grupos chegaram ao quintile 5, sendo que de junho para julho o grupo NIT+ pulou do quintile 1 para o 3. Previamente, na análise dos dados de todos os animais do presente estudo, este proxie foi correlacionado positivamente com valores radiográficos de distância de afundamento e ângulo palmar, o que significa que os animais com maior resposta insulínica aguda à glicose apresentaram mais alterações radiográficas de casco indicadoras de laminite (Ribeiro, 2017; Ribeiro *et al.*, 2017b). Lewis *et al.* (2017) encontraram boa correlação do proxie MIRG e do escore corporal com a presença de um marcador genético presente em cavalos Puro-Sangue-Árabes com histórico de SME e laminite. Considerando o exposto, poderia-se considerar este proxie um bom indicador de laminite endocrinopática, no entanto é importante destacar a necessidade de estudos mais aprofundados, que levem em consideração o equipamento de mensuração da insulina e da glicose, e a raça dos animais estudados, visto que outros estudos relataram a baixa acurácia na avaliação da resposta insulínica utilizando este proxie (Borer *et al.*, 2012).

Quanto menor o valor de HOMA-IR, maior a sensibilidade a insulina (Treiber *et al.*, 2005). Ao observarmos o gráfico, a falta de diferença entre os meses de junho e novembro no grupo NIT- é sugestiva de que houve uma adaptação mais eficaz à dieta, no que se refere à sensibilidade à insulina, o que não ocorre no grupo NIT+. Em humanos, o índice HOMA é utilizado na avaliação da resistência insulínica, e foi correlacionado a disfunção endotelial vascular em diabéticos (Kumari *et al.*, 2014), hipertensão em crianças obesas (Pugno *et al.*, 2017), adiposidade regional e hiperinsulinemia em adultos (Pourhassan *et al.*, 2017), por exemplo. Em equinos este proxie, assim como os demais, são considerados bastante específicos, porém pouco sensíveis (Treiber *et al.*, 2005), o que talvez seja a razão de haver poucos trabalhos que o utilizem ou procurem validá-lo para o diagnóstico da SME (Frank, 2011; Bertin e Laa, 2017).

Os níveis de IGF-1 livre dependem da síntese das suas formas ligadas a proteínas IGFBP-1 e IGFBP-2, que é realizada no fígado e inibida pela insulina (Clemmons e Underwood, 1991; Lukanova *et al.*, 2002). Estados mais insulinêmicos, que ocorrem na obesidade, por exemplo, estão relacionados a maior quantidade de IGF-1 livre, enquanto em indivíduos com resistência à insulina, como na diabetes tipo 2, possuem reduzidos níveis de insulina e IGF-1, e grandes quantidades de IGFBP (Clemmons e Underwood; Lukanova *et al.*, 2002). O que justifica que, no caso da síndrome metabólica, a resistência à insulina é inversamente proporcional às taxas de IGF-1 (Sesti *et al.*, 2005, Lam *et al.*, 2010, Koegelenberg *et al.*, 2016), sendo que o estresse oxidativo, a inflamação e a disfunção hepática têm um efeito de redução ainda maior sobre estas taxas (Koegelenberg *et al.*, 2016). A correlação encontrada no grupo NIT+ entre o IGF-1 e dois indicadores de desregulação insulínica – proxie QUICKI e área sob a curva de insulina –, corrobora a relação deste hormônio com estados mais insulinêmicos. Portanto, considerando-se os níveis de IGF-1 e comportamento da insulina no presente estudo, poderia-se sugerir que os animais não chegaram a desenvolver um estado de resistência insulínica tecidual, o que concordaria com a interpretação dos resultados do teste dinâmico (figura 3.11). No entanto, seria necessário realizar testes de tolerância à insulina para confirmar a resistência insulínica tecidual. Em equinos alguns achados sugerem que a laminite endocrinopática estaria relacionada a baixos valores de IGF-1 (Menzies-Gow *et al.*, 2017; Meier *et al.*, 2020), o que condiz também com o metabolismo deste hormônio e sua relação com a resistência à insulina. Talvez se os animais tivessem sido submetidos a dieta hipercalórica por um tempo mais prolongado, aqueles susceptíveis à SME poderiam ter desenvolvido laminite endocrinopática e provavelmente redução dos níveis de IGF-1.

Receptores de insulina e IGF-1 são relativamente específicos para seus ligantes, no entanto, em estados de hiperinsulinemia, a insulina se liga ao receptor de IGF-1 e vice-versa (Laviola *et al.*, 2007). Além disso, células que possuem receptores de IGF-1 e insulina simultaneamente apresentam receptores híbridos, nos quais tanto a insulina quanto o IGF-1 podem se ligar, com mais afinidade, em geral, para o IGF-1 (Soos e Siddle, 1989; Moxham *et al.*, 1989; Slaaby *et al.*, 2006; Laviola *et al.*, 2007). No trabalho de Rahnama (2020) o IGF-1 causou a proliferação celular lamelar *in vitro* e a utilização de um anticorpo comercial bloqueador de receptor de IGF-1 *in vivo* atenuou os efeitos da laminite induzida pelo clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, mostrando a íntima relação deste hormônio com a fisiopatologia da laminite endocrinopática e concordando com as presentes evidências da atuação do IGF-1 na SME. Estudos recentes apontam para a possibilidade da atuação do receptor de IGF-1 na transição das células epiteliais para mesenquimais no casco (Burns *et al.*, 2015; van Eps e Burns, 2019), um fenômeno que é bem conhecido no câncer e processo de metástase (Li *et al.*, 2017), e que pode ser o responsável pela proliferação celular e falha de conexão das lâminas observados na laminite endocrinopática. É interessante destacar que o presente estudo traz informações sobre as alterações que ocorrem antes do pleno estabelecimento da desregulação insulínica, a partir de um delineamento experimental que se aproxima do curso natural do desenvolvimento da SME, portanto os níveis de IGF-1 crescentes no grupo NIT+ pode estar diretamente relacionado a alterações lamelares e susceptibilidade destes animais ao desenvolvimento de laminite.

Em ambos os grupos estudados no presente trabalho houve correlação do IGF-1 com indicadores de adiposidade e lipoproteínas. Dados em seres humanos mostram que os níveis de IGF-1 livre podem estar correlacionados de formas diferentes com a adiposidade, de acordo com a adiposidade da população estudada, sendo encontrados valores negativamente correlacionados em pessoas obesas ou muito magras e positivamente correlacionados em pessoas com índice de massa corpórea moderada (Yamamoto e Kato, 1993; Lukanova *et al.*, 2002). Considerando que os animais iniciaram o período experimental com escore médio de 2,8 e terminaram com um escore médio de 8,5, o aumento dos níveis de IGF-1 concorda com estes trabalhos. Como citado, possivelmente a redução dos níveis deste hormônio causada pela obesidade não foi observada porque não houve tempo suficiente de exposição à dieta hipercalórica para o desenvolvimento do estado de resistência à insulina tecidual.

Considerando a atuação anabólica da insulina, estimulando a formação de VLDL, síntese e estocagem de triglicérides e inibição da lipólise (Norris e Carr, 2013), a correlação entre IGF-1 e obesidade, lipoproteínas e lípides plasmáticos seria esperada, no entanto a mesma não ocorreu de forma linear. No grupo NIT+ a correlação do IGF-1 ocorreu com maior número de variáveis, incluindo todas as frações de colesterol e os triglicérides, enquanto o grupo NIT- não apresentou correlação com triglicérides ou colesterol VLDL, e apresentou correlação negativa com o peso. Liang *et al.* (2016) correlacionaram o IGF-1 positivamente aos níveis de HDL e índice de massa corporal em crianças e adolescentes não diabéticos. Outro estudo correlacionou negativamente o IGF-1 aos níveis de colesterol LDL em crianças de baixa estatura, sugerindo que o primeiro possa interferir na regulação e metabolismo de colesterol, visto que crianças de baixa estatura e altos níveis de colesterol LDL têm maior risco de doença arterial coronariana na vida adulta (Zhao *et al.*, 2019). El-Maaty *et al.* (2017) relataram correlação entre níveis de IGF-1 e razão circunferência torácica: altura de cernelha em éguas de policiamento, e observaram que animais obesos apresentavam maiores valores de IGF-1, triglicérides e razão glicose: insulina, o que sugere uma relação deste hormônio com o aumento da adiposidade e hipertrigliceridemia, mas não com desregulação insulínica. Homens saudáveis tratados com IGF-1 apresentam redução dos triglicérides e colesterol, talvez por atuação sobre os receptores de insulina hepáticos (Oscarsson *et al.*, 1995). Como pode-se observar, a interferência do IGF-1 na lipídemia e colesterolemia foram documentados anteriormente, porém carecem de estudos que desvendem seus mecanismos e justifiquem a variedade de resultados descritos na literatura.

Um dos possíveis limitantes na avaliação dos parâmetros clínico-laboratoriais dos animais do presente estudo foi a interferência da coleta das biópsias de casco no início e ao final do período experimental. Pois a liberação de adrenalina ou cortisol nos equinos, pelo estresse ou dor, reduz a sensibilidade à insulina (Frank *et al.*, 2010; Tóth *et al.*, 2010) e aumenta a liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo (Norris e Carr, 2013). É importante ressaltar, portanto, que os animais foram submetidos a anestesia local durante o procedimento e correto controle da dor após as coletas, e qualquer efeito adicional relativo ao procedimento foi sofrido por ambos os grupos, indistintamente.

Em resumo, este estudo traz evidências que reforçam a maior susceptibilidade de alguns cavalos, especialmente os menores, ao desenvolvimento de desequilíbrios metabólicos decorrentes de uma dieta hipercalórica, sugerindo que o estresse oxidativo/nitrosativo lamelar

possa ser um marcador dessa susceptibilidade. Os indivíduos do grupo que apresentou marcação para nitrotirosina nas lâminas dos cascos (NIT+) apresentaram dislipidemia, um achado recorrente na síndrome metabólica equina, e apresentaram, de forma mais acentuada que o grupo sem estresse oxidativo/nitrosativo lamelar (NIT-), ganho de peso, aumento de adiposidade e aumento de indicadores de desregulação insulínica (aumento da insulinemia em jejum, aumento da área sob a curva de insulina, redução dos proxies G:I, RISQI e QUICKI e aumento do HOMA-IR). Valores elevados de IGF-1 apresentaram correlação com indicadores de desregulação insulínica no grupo NIT+ no presente estudo – área sob a curva de insulina e o proxy QUICKI –, porém estudos mais aprofundados sobre o papel deste hormônio na laminite endocrinopática e seu valor diagnóstico precisam ser elucidados. O IGF-1 correlacionou-se positivamente também com marcadores de adiposidade e de dislipidemia em ambos os grupos, mas com maior número de variáveis no grupo com estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Considerando a atividade anabólica deste hormônio e sua interferência em processos metabólicos que envolvem a insulina descritos na literatura, mais estudos são necessários para elucidar sua atuação na síndrome metabólica equina. Os animais não apresentaram sinais de laminite ao longo do período experimental (Ribeiro, 2017), portanto as alterações encontradas podem ser consideradas significativas, visto que foram resultado apenas da dieta hipercalórica a qual foram submetidos. As diferenças entre os grupos com (NIT+) e sem (NIT-) marcação para nitrotirosina nos cascos é um indicativo de que o estresse oxidativo/nitrosativo lamelar pode ser um marcador da desregulação insulínica e da susceptibilidade dos equinos à laminite endocrinopática.

### 3.5 Conclusão

O desenvolvimento de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar em equinos Mangalarga Marchador induzidos à obesidade por dieta rica em carboidratos não estruturais ocorreu em indivíduos de menor estatura (sujeitos à classificação de pôneis) e que apresentaram aumento de indicadores de desregulação insulínica, dislipidemia e elevação sérica de IGF-1 de forma significativa e mais acentuada. De forma interessante, esses mesmos equinos apresentaram, antes do oferecimento da dieta, sinais consistentes de maior sensibilidade à insulina como menor insulinemia basal, menor resposta insulêmica ao teste de glicose oral e melhores indicativos *proxies* quanto comparados ao grupo que não desenvolveu estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. O IGF-1 se correlacionou com variáveis indicadoras de

desregulação insulínica e dislipidemia, especialmente no grupo de cavalos que apresentou estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Os resultados indicam que equinos mais susceptíveis a expressar disfunção insulínica e dislipidemia são mais propensos a apresentar estresse oxidativo/nitrosativo lamelar e alterações séricas de IGF-1, demonstrando que ambos os fatores podem ser relevantes na fisiopatologia do desenvolvimento da síndrome metabólica equina, podendo inclusive servir como biomarcadores. Os dados apresentados também reforçam a noção de que equinos mais baixos, neste estudo com altura de cernelha inferior a 140 cm, são mais propensos à síndrome metabólica

### 3.6 Referências Bibliográficas

BAMFORD, N. J., POTTER, S. J., BASKERVILLE, C. L., *et al.* Effect of increased adiposity on insulin sensitivity and adipokine concentrations in different equine breeds adapted to cereal-rich or fat-rich meals. *Vet. J.*, v. 214, p. 14-20, 2016.

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.

BERTIN, F. R., DE LAAT, M. A. The diagnosis of equine insulin dysregulation. *Equine Vet. J.*, v. 49, n. 5, p. 570-576, 2017.

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, n. 4, p. 444-448, 2012.

BURNS, T. A., WATTS, M. R., WEBER, P. S., *et al.* Laminar inflammatory events in lean and obese ponies subjected to high carbohydrate feeding: implications for pasture-associated laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 47, n. 4, p. 489-493, 2015.

BURNS, T. A., TORIBIO, R. E. Metabolic Syndrome in Humans and Horses: The Relationship Between Obesity and Insulin Resistance. In: Belknap, J. K., Geor, R. J. (Eds.). *Equine Laminitis*. John Wiley & Sons, 2017, p. 149-166.

CLEMMONS, D. R., UNDERWOOD, L. E. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 11, n. 1, p. 393-412, 1991.

CORREA, F. H.; NOGUEIRA, V. G.; BEVILÁCQUA, 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. Metabol.*, v. 51, n. 9, p. 1498 – 1505, 2007.

DE MARCHI, E., BALDASSARI, F., BONONI, A., *et al.* Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, v. 2013, 2013.

DUCLUZEAU, P. H., COUSIN, P., MALVOISIN, E., *et al.* Glucose-to-insulin ratio rather than sex hormone-binding globulin and adiponectin levels is the best predictor of insulin resistance in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, v. 88, n. 8, p. 3626-3631, 2003.

DURHAM, A. E. Laminitis in Equine Metabolic Syndrome. In: Belknap, J. K., Geor, R. J. (Eds.). *Equine Laminitis*. John Wiley & Sons, 2017a, p. 196-201.

DURHAM, A. E., FRANK, N., MCGOWAN, C. M., *et al.* ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *J. Vet. Intern. Med.*, 33(2), 335-349, 2019.

DURWARD-AKHURST, S. A., SCHULTZ, N. E., NORTON, E. M., *et al.* Associations between endocrine disrupting chemicals and equine metabolic syndrome phenotypes. *Chemosphere*, v. 218, p. 652-661, 2019.

EL-MAATY, A. M. A., MOHAMED, A. H., ABU-AITA, N. A., MORGAN, H. M. Markers for predicting overweight or obesity of broodmares. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 56, p. 9-18, 2017.

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.

ENGELKING, L. R. Overview of Lipid Metabolism. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, Updated 2/e. Academic Press. 2010, p. 298-302.

ERTELT, A., BARTON, A. K., SCHMITZ, R. R., GEHLEN, H. Metabolic syndrome: is equine disease comparable to what we know in humans?. *Endocr. Connec.*, v. 3, n. 3, R81-R93, 2014.

FEI –Fédération Equéstré Internationale. Pony Measurements, 2019. Disponível em <[https://inside.fei.org/sites/default/files/SF2019\\_Session\\_3\\_Pony%20Measuring\\_Final.pdf](https://inside.fei.org/sites/default/files/SF2019_Session_3_Pony%20Measuring_Final.pdf) >. Acesso em 26 de novembro de 2020.

FRANK, N. Equine metabolic syndrome. *Vet. Clin. Equine*, v. 27, n. 1, p. 73-92, 2011.

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.24, n.3, p.467-475, 2010.

FRANK, N., BAILEY, S., BERTIN, F., *et al.* Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Equine Metabolic Syndrome. In: *Equine Endocrinology Group*. June 2020. Disponível em: <https://sites.tufts.edu/equineendogroup/>. Acessado em setembro de 2020.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY R. I.; FREDRICKSON 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.

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.

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.

HOLBROOK, T. C., TIPTON, T., MCFARLANE, D. Neutrophil and cytokine dysregulation in hyperinsulinemic obese horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 145, n.1-2, p. 283-289, 2012.

JACOB, S. I., GEOR, R. J., WEBER, P. S. D., *et al.* Effect of age and dietary carbohydrate profiles on glucose and insulin dynamics in horses. *Equine veterinary journal*, v. 50, n. 2, p. 249-254, 2018.

KAHN, C. R. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism*, v. 27, n.12, p. 1893-1902, 1978.

KANEKO, J. J; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Appendix VIII - Blood Analyte Reference Values in Large Animals. In: Kaneko, J. J; Harvey, J. W.; Bruss, M. L., *Clinical biochemistry of domestic animals.*, San Diego, California, ed. Academic Press, 1997, p. 881-888.

KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.*, v. 2014, 2014.

KESHAVARZIAN, A., BANAN, A., FARHADI, A., *et al.* Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, v.52, n. 5, p.720-728, 2003.

KINNUNEN, S., HYYPPÄ, S., LAPPALAINEN, J., *et al.* Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 93, n. 4, p. 496-501, 2004.

KNOWLES, E. J., WITHERS, J. M., MAIR, T. S. Increased plasma fructosamine concentrations in laminitic horses. *Equine Vet. J.*, v. 44, n. 2, 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, n. 2, p. 249-251, 2014.

KOEGELENBERG, A. S. E., SCHUTTE, R., SMITH, W., SCHUTTE, A. E. Bioavailable IGF-1 and its relation to the metabolic syndrome in a bi-ethnic population of men and women. *Horm. Metab. Res.*, v. 48, n. 02, p. 130-136, 2016.

KÖLLER, G., BASSEWITZ, K., SCHUSSER, G. F. Reference ranges of insulin, insulin like growth factor-1 and adrenocorticotrophic hormone in ponies. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere*, v. 44, n. 01, p. 19-25, 2016.

KRONFELD, D. S., TREIBER, K. H., HESS, T. M., *Et al.* Metabolic syndrome in healthy ponies facilitates nutritional countermeasures against pasture laminitis. *J. Nutr.*, v. 136, n. 7, p. 2090S-2093S, 2006.

KUMARI, N. R., RAJU, I. B., DEVI, M. A., PRAVEEN, M. P. Association between Homa Index and Vascular Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients. *Open J. Intern. Med.*, v. 4, n. 04, p. 123, 2014.

LAM, C. S., CHEN, M. H., LACEY, S. M., *et al.* Circulating insulin-like growth factor-1 and its binding protein-3: metabolic and genetic correlates in the community. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 30, n. 7, p. 1479-1484, 2010.

LASKOSKI, L. M., DITTRICH, R. L., VALADÃO, C. A. A., *et al.* Oxidative stress in hoof lamellar tissue of horses with lethal gastrointestinal diseases. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 171, p. 66-72, 2016.

LAVIOLA, L., NATALICCHIO, A., GIORGINO, F. The IGF-I signaling pathway. *Curr. Pharm. Des.*, v. 13, n. 7, p. 663-669, 2007.

LEGRO, R. S., FINEGOOD, D., DUNAIF, A. A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, v. 83, n. 8, p. 2694-2698, 1998.

LEWIS, S. L., HOLL, H. M., STREETER, C., *et al.* A. Genomewide association study reveals a risk locus for equine metabolic syndrome in the Arabian horse. *J. Anim. Sci.*, v.95, n.3, p.1071-1079, 2017.

LI, H., BATTH, I. S., QU, X., *et al.* IGF-IR signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-IR therapy: overview and new insights. *Mol. Cancer*, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2017.

LIANG, S., HU, Y., LIU, C., *et al.* Low insulin-like growth factor 1 is associated with low high-density lipoprotein cholesterol and metabolic syndrome in Chinese nondiabetic obese children and adolescents: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis.*, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2016.

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, AND R. J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUKANOVA, A., SÖDERBERG, S., STATTIN, P., *et al.* Nonlinear relationship of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-I/IGF-binding protein-3 ratio with indices of adiposity and plasma insulin concentrations (Sweden). *Cancer Causes Control*, v. 13, n. 6, p. 509-516, 2002.

MCTERNAN, P.G., ANWAR, A., AND KUMAR, S. Relationship between fat distribution and insulin resistance. In: S. Kumar and S. O’Rahilly (Eds). *Insulin Resistance: Insulin action and its disturbances in disease*. JohnWiley & Sons, Ltd, 2015, p. 207–235.

MEIER, A. D., DE LAAT, M. A., REICHE, D. B., SILLENCE, M. N. Glucagon-like peptide-1, insulin-like growth factor-1, and adiponectin in insulin-dysregulated ponies: effects of feeding a high nonstructural carbohydrate diet and association with prospective laminitis. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 71, p. 106397, 2020.

MILES, J., GLASSCOCK, R., AIKENS, J., *et al.* A microfluorometric method for the determination of free fatty acids in plasma. *J. Lipid Res.*, v.24, n. 1, p. 96-99, 1983.

MORFELD, K. A., BROWN, J. L. Metabolic health assessment of zoo elephants: Management factors predicting leptin levels and the glucose-to-insulin ratio and their associations with health parameters. *PLoS One*, v. 12, n. 11, e0188701, 2017.

MORGAN, R. A., MCGOWAN, T. W., MCGOWAN, C. M. Prevalence and risk factors for hyperinsulinaemia in ponies in Queensland, Australia. *Aust. Vet. J.*, v. 92, n. 4, p. 101-106, 2014.

MOXHAM, C. P., DURONIO, V., JACOBS, S. Insulin-like growth factor I receptor beta-subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 13238-44, 1989.

NORRIS, D. O., CARR, J. A. Chemical Regulation of Feeding, Digestion and Metabolism. In: Norris, D. O., Carr, J. A. (2013). *Vertebrate endocrinology*. Academic Press. P. 443-481. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394815-1.00012-4>.

OKOUCHI, M., OKAYAMA, N., IMAI, S., *et al.* High insulin enhances neutrophil transendothelial migration through increasing surface expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 via activation of mitogen activated protein kinase. *Diabetologia*, v. 45, n. 10, p. 1449-1456, 2002.

OSCARSSON, J., LUNDSTAM, U., GUSTAFSSON, B., *et al.* Recombinant human insulin-like growth factor-I decreases serum lipoprotein (a) concentrations in normal adult men. *Clin. Endocrinol.*, v. 42, n. 6, p. 673-676, 1995.

PATTULLO, K. M., KIDNEY, B. A. Reference Point: Exploring fructosamine beyond diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 244, n. 11, p. 1268-1277, 2014.

PLEASANT, R. S., SUAGEE, J. K., THATCHER, C. D., *et al.* Adiposity, plasma insulin, leptin, lipids, and oxidative stress in mature light breed horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v.27, n. 3, p. 576-582, 2013.

POURHASSAN, M., GLÜER, C. C., PICK, P., *et al.* Impact of weight loss-associated changes in detailed body composition as assessed by whole-body MRI on plasma insulin levels and homeostatis model assessment index. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 71, n. 2, p. 212-218, 2017.

PRATT, S. E., SICILIANO, P. D., WALSTON, L. Variation of insulin sensitivity estimates in horses. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 29, n. 6, p. 507-512, 2009.

PRATT-PHILLIPS, S. E., OWENS, K. M., DOWLER, L. E., CLONINGER, M. T. Assessment of resting insulin and leptin concentrations and their association with managerial and innate factors in horses. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 30, n. 3, p. 127-133, 2010.

PUGNO, A., ZAMBELLI, D., DE BENEDETTI, C., *et al.* [LB.02.01] Homa index as a predictor of hypertension in a pediatric obese population. *J. Hypertens.*, v. 35, p e48, 2017. doi: 10.1097/01.hjh.0000523100.46266.28

RAHNAMA, S. The development of a novel treatment for equine laminitis. 2020, 145f. Tese (Doctoral dissertation), Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.

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

RIBEIRO, R. M., MENDES, H. M., VALADARES, R. C., *et al.* A novel equine hoof lamellar tissue biopsy technique. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 49, p. 63-68, 2017a.

RIBEIRO, R. R., RIBEIRO, D. S. F., DUARTE, P. C., FALEIROS, R. R. Biomarcadores de disfunção insulínica e medidas radiográficas indicadoras de laminite em equinos Mangalarga Marchador com obesidade induzida. In: ANAIS DO ENCONTRO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA IBVET, 2017b. Campinas, Galoá, 2017b (Resumo). Disponível em: <<https://proceedings.science/encontro-ibvet/trabalhos/biomarcadores-de-disfuncao-insulinica-e-medidas-radiograficas-indicadoras-de-laminite-em-equinos>> Acesso em: 11 set. 2020.

RIBEIRO, R. M., RIBEIRO, D. S.F., PAZ, C. F.R., *et al.* Adiposity and weight gain in Mangalarga Marchador horses subjected to hypercaloric diet. *Pesq. Vet. Bras.*, v.40, n. 3, p. 170-175, 2020. Epub May 29, 2020. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6178>

RIVERO, J. L., PIERCY, R. J. Muscle physiology: responses to exercise and training. In: Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., Geor, R. J. (2013). *Equine Sports Medicine and Surgery E-Book*. Elsevier Health Sciences, p. 69-108.

SAFRANOVA, V. G., GABDOULKHAKOVA, A. G., MILLER, A. V., *et al.* Variations of the effect of insulin on neutrophil respiratory burst. The role of tyrosine kinases and phosphatases. *Biochemistry (Moscow)*, v.66, n. 8, p. 840-849, 2001.

SALINAS, C., ESPINOSA, G., MORALES, N., *et al.* Assessment of peripheral blood neutrophil respiratory burst, phagocytosis and apoptosis in obese non-insulin dysregulated horses. *Res. Vet. Sci.*, v. 132, p.127-132, 2020.

SEN C. K., PACKER L., HANNINEN, O. Preface. In: *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise* (2000). Elsevier, Amsterdam, p. V.

SESTI, G., SCIACQUA, A., CARDELLINI, M., *et al.* Plasma concentration of IGF-I is independently associated with insulin sensitivity in subjects with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes care*, v. 28, n. 1, p. 120-125, 2005.

SLAABY, R., SCHÄFFER, L., LAUTRUP-LARSEN, I., *et al.* Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant. *J. Biol.*, v. 281, n. 36, p. 25869-25874, 2006.

SMITH, S., HARRIS, P. A., MENZIES-GOW, N. J. Comparison of the in-feed glucose test and the oral sugar test. *Equine Vet. J.*, v. 48, n. 2, p. 224-227, 2016.

SOOS, M. A., SIDDLE, K. Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I. Evidence for structural heterogeneity of insulin-like growth factor I receptors involving hybrids with insulin receptors. *Biochem. J.*, v. 263, p. 553-63, 1989.

TÓTH, F., FRANK, N., GEOR, R. J., BOSTON, R. C. Effects of pretreatment with dexamethasone or levothyroxine sodium on endotoxin-induced alterations in glucose and insulin dynamics in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 71, n. 1, p. 60-68, 2010.

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, n. 12, p. 2114-2121, 2005.

TREIBER, K. H., KRONFELD, D. S., HESS, T. M., *et al.* Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 228, n. 10, p. 1538-1545, 2006.

VALLE, E., STORACE, D., SANGUINETI, R., *et al.* Association of the glycoxidative stress marker pentosidine with equine laminitis. *Vet. J.*, v. 196, n. 3, p. 445-450, 2013.

VAN EPS, A. W., BURNS, T. A. Are there shared mechanisms in the pathophysiology of different clinical forms of laminitis and what are the implications for prevention and treatment?. *Vet. Clin. Equine*, v. 35, n. 2, p. 379-398, 2019.

VICK, M. M., ADAMS, A. A., MURPHY, B. A., *et al.* Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of animal science*, v. 85, n. 5, p. 1144-1155, 2007.

WALLER, A. P., HUETTNER, L., KOHLER, K., LACOMBE, V. A. Novel link between inflammation and impaired glucose transport during equine insulin resistance. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 149, n. 3-4, p. 208-215, 2012.

WALRAND, S., GUILLET, C., BOIRIE, Y., VASSON, M. P. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. *J. Leukoc. Biol.*, v. 76, n. 6, p. 1104-1110, 2004.

WALRAND, S., GUILLET, C., BOIRIE, Y., VASSON, M. P. Insulin differentially regulates monocyte and polymorphonuclear neutrophil functions in healthy young and elderly humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 91, n. 7, p. 2738-2748, 2006.

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.

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

YAMAMOTO, H., KATO, Y. Relationship between Plasma Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) Levels and Body Mass Index (BMI) in Adults. *Endocr. J.*, v. 40, n. 1, p. 41-45, 1993.

ZHAO, Q., JIANG, Y., ZHANG, M. Low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with insulin-like growth factor-1 in short-stature children and adolescents: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis.*, v.18, n.1, p. 120, 2019.

## **CAPÍTULO 4 - Mensurações histológicas e radiográficas de cascos de equinos com estresse oxidativo/nitrosativo lamelar pela indução experimental de obesidade**

### **Resumo**

Animais com laminite, e mesmo aqueles com síndrome metabólica ainda sem sinais clínicos de laminite, apresentam mudanças conformacionais no casco e alterações da relação casco-falange. Neste capítulo, foram avaliadas radiografias de casco realizadas a cada 30 dias durante o período experimental e comparando-se os grupos NIT+ e NIT- conforme descrito nos capítulos anteriores. Também foram avaliados os aspectos histopatológicos lamelares antes e após o período experimental dentro dos grupos e entre os grupos estudados. NIT+ apresentou menores comprimentos de lâminas epidermais primárias e uma redução significativa das lâminas epidermais secundárias após a dieta, o que não foi observado em NIT-. As medidas radiográficas da distância de afundamento, um dos principais marcadores de laminite, se elevaram durante o tempo apenas em equinos NIT+. Considerando as observações, é reforçada a prerrogativa de que existem cavalos naturalmente mais vulneráveis à laminite endocrinopática por síndrome metabólica, e que o estresse oxidativo/nitrosativo lamelar é parte deste processo patológico, podendo estar intimamente relacionado a mudanças histológicas e conformacionais do casco em animais submetidos a dietas altamente energéticas.

### **Abstract**

Studies involving oxidative stress immunostaining in the horse's laminae have indicated that imbalances begin in the hoof before the onset of clinical signs of laminitis, which is a disease that can be fatal for horses. Understanding the pathophysiology of the laminitis prodromal phase allows its prevention, thus reducing economic and emotional stress to horse owners. In this study, 9 healthy horses were used, submitted to a high calorie diet for 5 months. Hoof radiographs were taken every 30 days during the experimental period and hoof biopsies were collected before the beginning and at the end of the experimental period. Hoof nitrotyrosine and superoxide dismutase immunostaining were evaluated and the animals were separated into groups according to the results: positive (NIT+) or negative (NIT-) for nitrotyrosine immunostaining. The groups had 4 and 5 animals, respectively. The NIT + group showed shorter lengths of primary epidermal laminae and a significant reduction in secondary epidermal laminae after diet, which was not observed in the NIT- group. Radiographic measurements of

the sinking, one of the main markers of laminitis, increased along the months only in NIT + horses. Considering the observations, the prerogative that horses are naturally more vulnerable to endocrinopathic laminitis due to metabolic syndrome is reinforced, and that lamellar oxidative stress is part of this pathological process, and may be closely related to histological and conformational changes of the hoof in animals submitted to highly energetic diets.

#### **4.1 Introdução**

A susceptibilidade à laminite endocrinopática é a consequência mais relevante da síndrome metabólica equina (SME), e seu diagnóstico é baseado no histórico do animal ou sinais clínicos de laminite somado a evidências de desregulação insulínica (Durham *et al.*, 2019). No entanto, pouco se sabe sobre a fase prodrômica da doença, principalmente quando se considera que o modelo experimental de indução da laminite endocrinopática é feito por meio de 48h de hiperinsulinemia e causa laminite em todos os animais indistintamente (Asplin *et al.*, 2007), enquanto a doença natural está sujeita a fatores epigenéticos, não acometendo a todos os indivíduos submetidos às mesmas condições (Treiber *et al.*, 2006a, Treiber *et al.*, 2006b; McCue *et al.*, 2015). Mudanças conformacionais da relação casco-falange foram identificadas em animais obesos de raças predispostas à laminite endocrinopática (Magalhães *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2017), com ênfase para alterações na distância de afundamento da falange distal mesmo em animais sem qualquer sinal clínico ainda evidente, o que reforça o caráter silencioso do desenvolvimento dessa doença e a necessidade de conhecer sua evolução para tomar medidas preventivas precoces.

Com base nos resultados do estudo anterior, que demonstraram que o estresse oxidativo/nitrosativo lamelar ocorreu exclusivamente no grupo de equinos que desenvolveram de forma inequívoca desregulação insulínica, dislipidemia e alterações séricas de IGF-1 quando comparados aos seus pares, o presente estudo tem como objetivo comparar alterações radiográficas e histológicas de casco em cavalos da raça Mangalarga Marchador que desenvolveram ou não sinais de estresse oxidativo/nitrosativo no tecido lamelar do casco após por 5 meses de dieta hipercalórica rica em carboidratos não estruturais. Espera-se, com isso, contribuir para o conhecimento acerca do período mais precoce de desenvolvimento da laminite endocrinopática decorrente da síndrome metabólica equina (SME).

#### **4.2 Material e métodos**

### *Animais e dieta*

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com o número de protocolo 49/2014. Foram utilizados 9 equinos da raça Mangalarga Marchador, 4 machos castrados e 5 fêmeas, com idade média  $\pm$  DP (desvio-padrão) de  $48 \pm 5$  meses, peso médio inicial  $\pm$  DP de  $316 \pm 62,7$  kg e escore de condição corporal (ECC) médio  $\pm$  DP de  $2,9 \pm 1$ .

A dieta hipercalórica foi fornecida e calculada conforme o descrito no capítulo 2. Ao final do período experimental os animais apresentavam peso médio inicial  $\pm$  DP de  $402,77 \pm 58,31$  kg e escore de condição corporal (ECC) médio  $\pm$  DP de  $8,3 \pm 1$ .

### *Biópsia de cascos*

Duas amostras de cascos foram coletadas dos animais segundo a metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2017), sendo a primeira amostra retirada do casco do membro torácico esquerdo antes do início da dieta experimental e a segunda, do membro torácico direito após 150 dias.

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 micrômetros 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 Pannoramic 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 Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Utilizando a metodologia empregada por Kawasaki *et al.* (2009) e Karikoski *et al.* (2014) foi realizada a análise de histomorfometria e a categorização das lâminas, conforme descrito por Ribeiro (2017) e resumido a seguir.

As lâminas epidermais primárias (LEP) e lâminas epidermais secundárias (LES) foram divididas em porções abaxial, intermédia e axial utilizando-se como referências 10% da lâmina primária mais próxima ao casco, 50% da lâmina primária e 40% da extensão final da lâmina primária mais próxima ao periósteo da falange distal, respectivamente. As análises foram realizadas utilizando-se 40x de magnificação para as LEP e 200x para as LES.

Para a seleção das LEPs estudadas foi utilizado uma ferramenta de seleção aleatória presente no site <http://www.randomizer.org/form.html> após a numeração de cada uma. Foram então selecionadas 10 LEPs em cada corte e, dentro de cada LEP, foram selecionadas 30 LES distribuídas nas regiões axial, intermédia e abaxial, equitativamente selecionadas das superfícies esquerda e direita (5 lâminas de cada lado, em cada região).

As LEPs foram mensuradas e classificadas quanto ao seu comprimento total e seu formato com as seguintes características: padrão (reto), curvo (com 2 ou mais curvas) e com bifurcações. E cada região da LEP foi classificada conforme o descrito a seguir: a região abaxial em padrão, cônico, afiado ou bifurcado; a região axial em padrão, afiado, bifurcado, com características proliferativas (células disqueratóticas ligadas ao tecido dérmico), separadas (com lise da junção das células epidérmicas com as lâminas dérmicas) ou queratinizadas. As LES foram avaliadas quanto ao seu comprimento nas diferentes regiões (axial, intermédia e abaxial) e sua conformação, com as seguintes classificações, padrão, cônico, em forma de clava, hiperplasia da camada suprabasal (HCS), bifurcada, fundida, separada e queratinizada.

#### *Radiografias de casco*

Foram realizadas radiografias látero-mediais dos membros torácicos dos animais antes do início (basal) e a cada 30 dias. Por meio da análise das imagens pelo software Metron Hoof<sup>®</sup> (Metron-Hoof-Pro, versão 5.19) foram obtidas as seguintes medidas radiográficas de casco: 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 casco (suporte de casco), 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). Os dados obtidos pelo software foram analisados separadamente para o membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE). A figura 4.1 ilustra as mensurações realizadas.

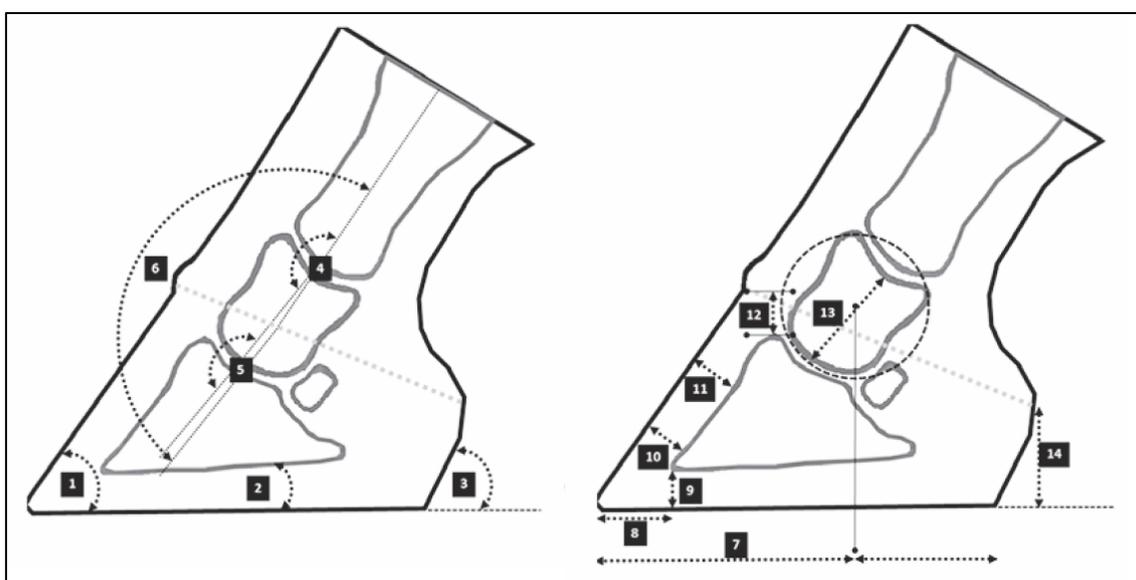


Figura 4.1. Mensurações realizadas em cascos de membros torácicos os animais utilizados por meio do Software Metron Hoof Pro. 1: ângulo do casco, 2: ângulo palmar, 3: ângulo da quartela, 4: ângulo da articulação interfalângica proximal (Interf. Prox.), 5: ângulo da articulação interfalângica distal (Interf. Dist.), 6: eixo entre o casco e quartela, 7: suporte do casco, 8: breakover, 9: espessura da sola, 10: distância casco-falange proximal (CF proximal), 11: distância casco-falange distal (CF distal), 12: afundamento, 13: comprimento da falange média, 14: comprimento da quartela. Imagem adaptada de Drumond *et al.*, 2016.

#### *Marcações imuno-histoquímicas de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar*

Conforme descrito no capítulo 2, foram realizadas biópsias de casco antes e após o período experimental e imunohistoquímica para marcação de superóxido dismutase e nitrotirosina. Dos 9 animais avaliados, 4 apresentaram marcação para nitrotirosina após 150 dias da dieta experimental. As demais amostras não apresentaram marcações para estresse

oxidativo/nitrosativo, tanto as testadas para nitrotirosina do início do período experimental quanto as testadas para SOD2 em ambos os momentos. Sendo assim os animais foram separados apenas em dois grupos, NIT+ e NIT-, para a realização das análises estatísticas.

#### *Análise estatística*

Os animais foram separados em grupos com (NIT+) ou sem (NIT-) marcação para nitrotirosina. Cada variável avaliada foi submetida ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. O teste T foi usado para comparar os grupos NIT+ e NIT-, e comparar os momentos basal e final tanto das mensurações morfométricas histológicas quanto a incidência dos padrões histológicos das LEPs e LES. A variação das medidas radiográficas dentro de cada grupo ao longo dos meses foi feito por One Way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls para comparação de pares dos momentos. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 8<sup>®</sup>, sendo considerada diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### **4.3 Resultados**

#### *Morfometria histológica*

O comprimento total da LEP foi significativamente diferente entre os grupos NIT+ e NIT- no tempo basal e no final. O menor comprimento do grupo NIT+ comparado ao NIT- pode ser observado na figura 4.2.

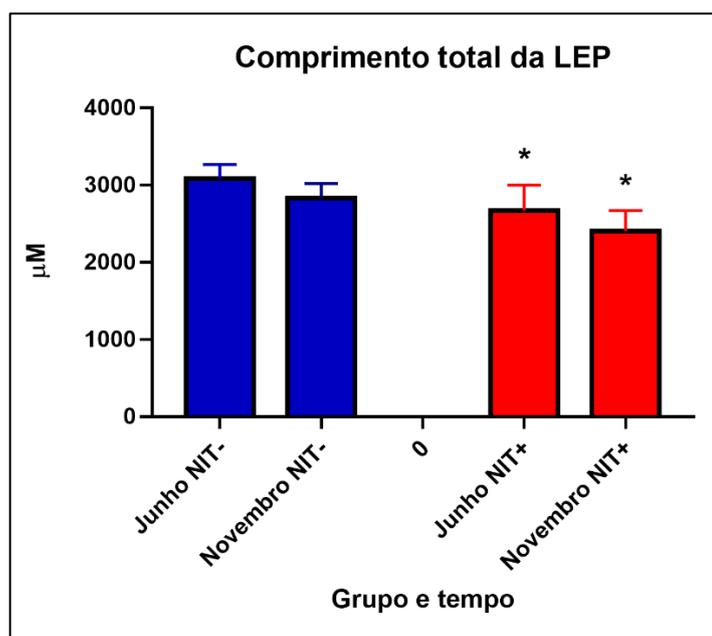


Figura 4.2. Gráfico com médias e erro-padrão do comprimento total das lâminas epidermais primárias (LEP) dos cascos de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses, divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar), antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Os símbolos \* representam diferença ( $p < 0,05$ ) pelo teste T entre os grupos NIT+ e NIT-, em junho e novembro.

As médias do comprimento da região intermédia da LES reduziram de junho para novembro. No entanto, houve diferença entre os momentos apenas dentro do grupo NIT+ (figura 4.3 e tabela 4.1). Os comprimentos das regiões axial e abaxial não tiveram diferença entre grupos ou entre tempos.

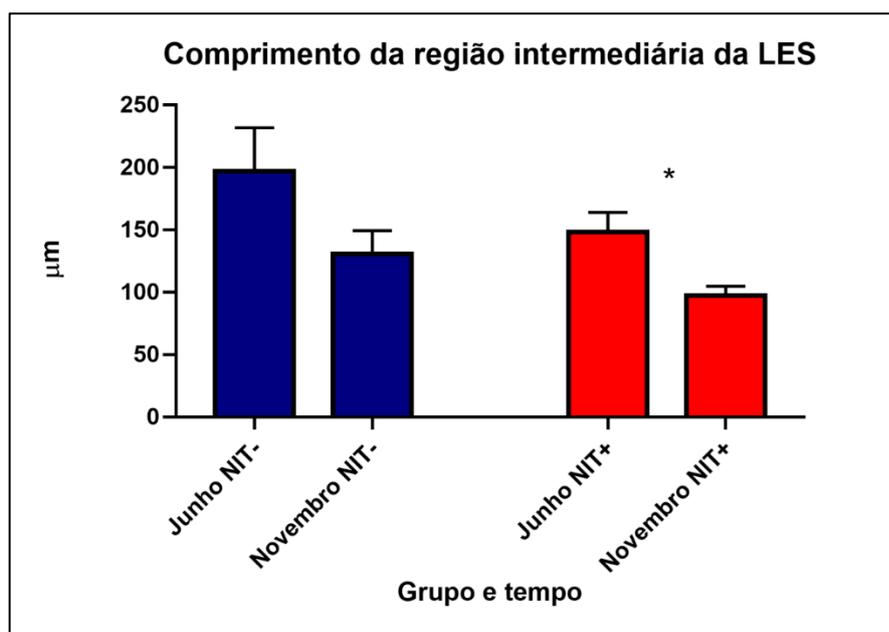


Figura 4.3. Gráfico com médias e erro-padrão do comprimento da região intermédia da lâmina epidermal secundária (LES) dos cascos de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a dieta hipercalórica por 5 meses, divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar), antes (junho) e após (novembro) o período experimental. O símbolo \* representa diferença ( $p < 0,05$ ) pelo teste T entre os meses de junho e novembro no grupo NIT+.

Na região abaxial da LEP a característica proliferativa das células foi significativamente menor no grupo NIT+ comparado ao NIT- antes do período experimental, porém no grupo NIT- esta característica reduziu significativamente após. Na comparação entre grupos, o formato afiado da região abaxial da LEP foi mais presente no grupo NIT+ após o período experimental e o formato separado foi mais presente no grupo NIT- após o período experimental (tabela 4.1).

Tabela 4.1. Médias e desvios padrão da ocorrência de diferentes formatos histológicos na região abaxial das LEP (lâminas epidermais primárias) de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a 5 meses de dieta hipercalórica e divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar) nos tempos antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Nas últimas 4 linhas estão presentes os valores de p nas comparações entre grupos e tempos respectivamente, com os valores menores que 0,05 destacados em negrito.

Padrão	Afiada	Bifurcada	Proliferativa	Separadas	Queratinizadas
--------	--------	-----------	---------------	-----------	----------------

Antes Nit-	Média	2,8	0,4	0,4	2	3,4	0
	DP	2,28	0,548	0,548	0,707	4,278	0
Após Nit-	Média	3	0,4	1	0,4	5	1,4
	DP	3,082	0,548	1,414	0,548	2,915	3,13
Antes Nit+	Média	3,25	1,25	0,75	0,5	5,25	0
	DP	3,948	1,893	0,5	0,577	4,992	0
Após Nit+	Média	5,5	1,75	0,5	0,5	1	0
	DP	3,512	0,5	1	1	1,414	0
Valor de p em NIT+ x NIT-	Antes	0,835	0,364	0,356	<b>0,011</b>	0,567	0,172
	Após	0,292	<b>0,007</b>	0,571	0,853	<b>0,041</b>	0,443
Valor de p antes x após	NIT+	0,427	0,628	0,67	>0,999	0,152	0,147
	NIT-	0,91	>0,999	0,402	<b>0,004</b>	0,509	0,351

Na região abaxial da LES houve redução significativa do formato padrão no grupo NIT+ comparando-se os tempos antes (junho) e após (novembro) a dieta hipercalórica. No grupo NIT- foi registrada significativa hiperplasia da camada suprabasal (HCS) após a dieta hipercalórica, característica ausente no tempo inicial (tabela 4.2).

Tabela 4.2. Médias e desvios padrão da ocorrência de diferentes formatos histológicos na região abaxial das LES (lâminas epidermais secundárias) de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a 5 meses de dieta hipercalórica e divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar) nos tempos antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Nas últimas 4 linhas estão presentes os valores de p nas comparações entre grupos e tempos respectivamente, com os valores menores que 0,05 destacados em negrito.

		Padrão	Cônica	Clava	HCS	Bifurcada	Fundida	Separada	Queratinizada	Comprimento
Antes Nit-	Media	6,000	3,000	0,200	0,000	0,800	0,000	0,000	0,000	164,883
	DP	4,583	3,742	0,447	0,000	0,837	0,000	0,000	0,000	56,765
Após Nit-	Media	1,400	2,200	0,200	3,000	3,200	0,400	0,000	1,400	113,954
	DP	0,894	2,683	0,447	2,550	2,280	0,548	0,000	3,130	18,075

Antes Nit+	Media	7,333	4,250	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	162,184
	DP	2,309	4,193	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	37,745
Após Nit+	Media	2,000	3,250	0,000	4,000	1,250	0,250	0,000	0,000	122,641
	DP	2,309	4,031	0,000	4,546	0,957	0,500	0,000	0,000	38,257
Valor de p em NIT+ x NIT-	Antes	0,662	0,651	0,407		0,287				0,938
	Após	0,606	0,652	0,407	0,687	0,157	0,685		0,407	0,664
Valor de p antes x após	NIT+	<b>0,029</b>	0,743		0,129	0,114	0,356			0,192
	NIT-	0,059	0,708	>0,99999 9	<b>0,030</b>	0,058	0,141		0,347	0,092

Na região intermédia da LES a média de ocorrência da forma de clava no grupo NIT+ após a dieta hipercalórica foi significativamente maior comparada ao grupo NIT- e também comparada à média do próprio grupo antes da dieta. No grupo NIT- a ocorrência de HCS aumentou e a forma padrão diminuiu na comparação entre tempos (tabela 4.3).

Tabela 4.3. Médias e desvios padrão da ocorrência de diferentes formatos histológicos na região intermedia das LES (lâminas epidermais secundárias) de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a 5 meses de dieta hipercalórica e divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar) nos tempos antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Nas últimas 4 linhas estão presentes os valores de p nas comparações entre grupos e tempos respectivamente, com os valores menores que 0,05 destacados em negrito.

		Padrão	Cônica	Clava	HCS	Bifurcada	Fundida	Separada	Queratinizada	Comprimento
Antes Nit-	Média	3,600	3,600	1,400	1,200	0,200	0,000	0,000	0,000	197,277
	DP	2,510	2,302	2,074	1,643	0,447	0,000	0,000	0,000	77,580
Após Nit-	Média	0,200	3,400	0,200	5,800	1,400	0,000	0,000	0,200	130,964
	DP	0,447	3,435	0,447	3,421	1,517	0,000	0,000	0,447	41,177
Antes Nit+	Média	4,000	3,500	0,750	1,000	0,750	0,000	0,000	0,000	148,501
	DP	4,243	4,041	1,500	1,414	0,957	0,000	0,000	0,000	31,091
	Média	0,500	0,750	4,250	3,250	2,500	0,000	0,000	0,000	97,329

Após Nit+	DP	0,577	0,957	1,258	1,708	2,082	0,000	0,000	0,000	15,332
Valor de p em NIT+ x NIT-	Antes	0,864	0,964	0,617	0,853	0,287				0,280
	Após	0,407	0,183	<b>0,000</b>	0,219	0,388			0,407	0,169
Valor de p antes x após	NIT+	0,153	0,234	<b>0,012</b>	0,089	0,177				<b>0,026</b>
	NIT-	<b>0,018</b>	0,917	0,242	<b>0,027</b>	0,128			0,347	0,130

O grupo NIT- apresentou diferença entre tempos na ocorrência das características padrão, clava, HCS e bifurcada na região axial da LES, tendo a primeira reduzido e as demais aumentado após a dieta. Comparando-se a ocorrência da forma bifurcada na LES após a dieta, o grupo NIT- também apresentou média superior ao NIT+. A ocorrência de HCS no grupo NIT+ aumentou significativamente após o período experimental (tabela 4.4).

Tabela 4.4. Médias e desvios padrão da ocorrência de diferentes formatos histológicos na região axial das LES (lâminas epidermais secundárias) de 9 cavalos Mangalarga Marchador submetidos a 5 meses de dieta hipercalórica e divididos em grupos NIT+ (4 animais com marcação para 3-nitrotirosina lamelar) e NIT- (5 animais sem marcação para 3-nitrotirosina lamelar) nos tempos antes (junho) e após (novembro) o período experimental. Nas últimas 4 linhas estão presentes os valores de p nas comparações entre grupos e tempos respectivamente, com os valores menores que 0,05 destacados em negrito.

		Padrão	Cônica	Clava	HCS	Bifurcada	Fundida	Separada	Queratinizada	Comprimento
Antes Nit-	Média	3,800	0,600	4,200	0,800	0,400	0,200	0,000	0,000	137,799
	DP	1,924	0,894	1,483	1,304	0,548	0,447	0,000	0,000	87,996
Após Nit-	Média	0,250	1,000	1,200	6,000	3,400	0,600	0,000	0,000	81,732
	DP	0,500	0,707	1,304	2,000	2,302	0,894	0,000	0,000	17,060
Antes Nit+	Média	3,750	0,250	2,250	0,750	2,750	0,250	0,000	0,000	86,404
	DP	3,500	0,500	1,893	1,500	2,500	0,500	0,000	0,000	30,947
Após Nit+	Média	1,000	0,750	1,250	6,000	0,500	0,750	0,000	0,000	85,872
	DP	0,816	0,500	1,893	1,414	0,577	1,500	0,000	0,000	39,312
	Antes	0,979	0,510	0,126	0,959	0,077	0,879			0,307

Valor de p em NIT+ x NIT-	Após	0,168	0,571	0,964	>0,999	<b>0,046</b>	0,857	0,836
Valor de p antes x após	NIT+	0,177	0,207	0,483	<b>0,002</b>	0,130	0,550	0,984
	NIT-	<b>0,009</b>	0,455	<b>0,009</b>	<b>0,001</b>	<b>0,022</b>	0,397	0,199

Os dados referentes aos demais parâmetros da LEP não tiveram diferença significativa entre grupos ou tempos.

### Medidas radiográficas

O suporte de casco do MTD foi significativamente menor no grupo NIT+ nos meses de agosto, setembro e outubro, enquanto no MTE a mesma diferença foi observada somente no mês de outubro. Ao longo dos meses a tendência das médias foi a redução, com diferença dentro dos grupos, conforme ilustra a figura 4.4.

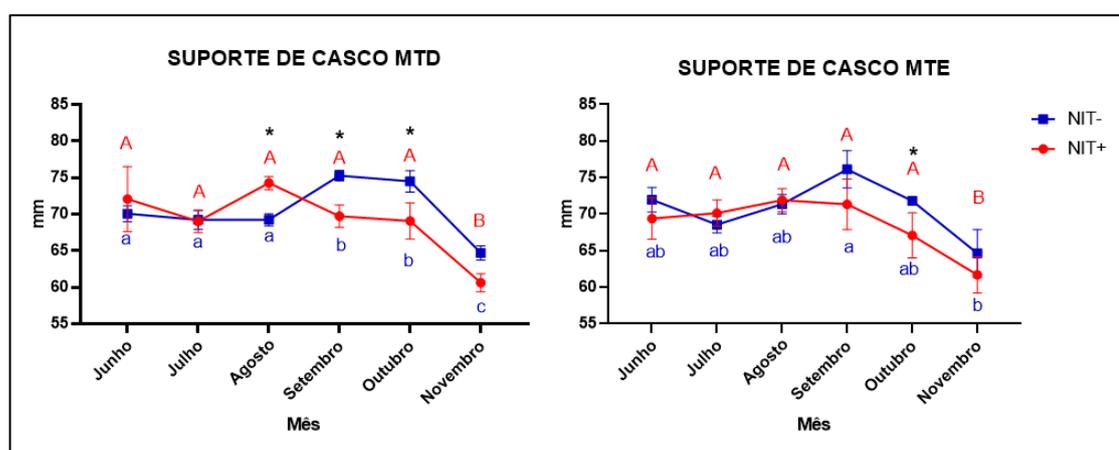


Figura 4.4. Gráficos com médias e erros padrão do suporte de casco do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica, divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+), e asteriscos sinalizam diferença pelo

teste T entre os grupos NIT- e NIT+ no respectivo mês. Em todas as análises foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

O ângulo da articulação interfalangeana distal foi significativamente menor no grupo NIT+ em quase todos os meses no MTD e MTE, exceto, apenas, nos meses de setembro e novembro no MTE (figura 4.5).

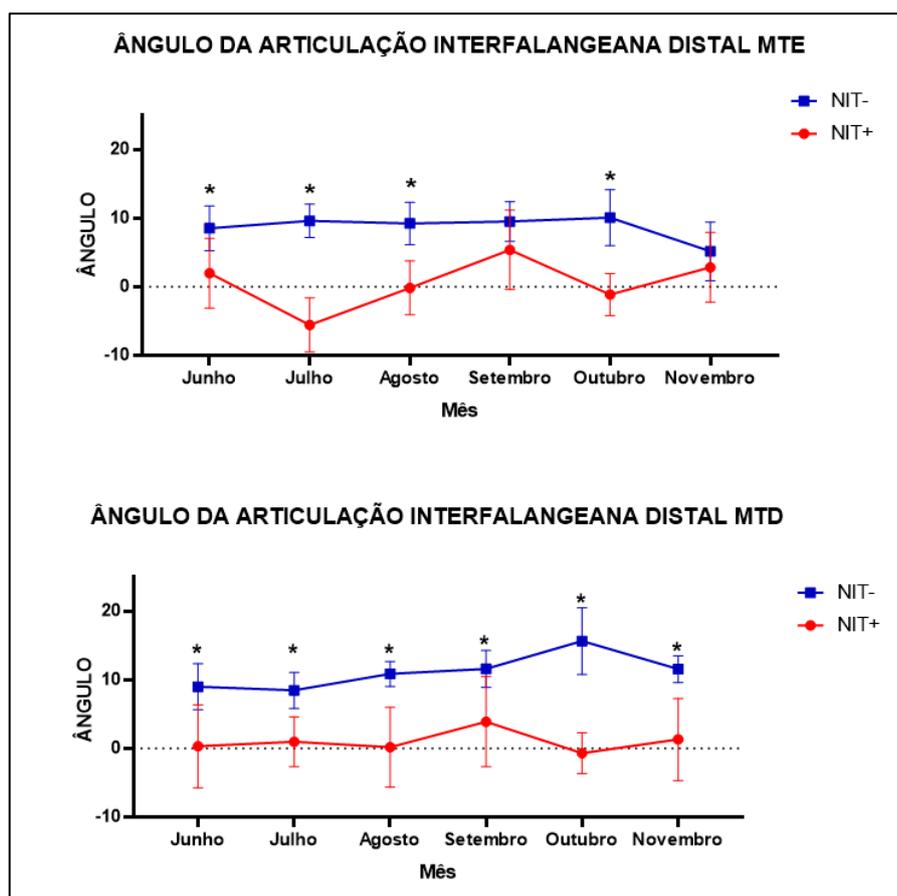


Figura 4.5. Gráficos com médias e erros padrão do ângulo da articulação interfalangeana do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 cavalos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica, divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Asteriscos sinalizam diferença pelo teste T entre os grupos NIT- e NIT+ no respectivo mês ( $p < 0,05$ ).

Na medida do ângulo de casco houve diferença entre os grupos NIT+ ( $50,74 \pm 3,82$ ) e NIT- ( $46,03 \pm 3,27$ ) no MTE no mês de junho, e no MTD nos meses de setembro (NIT+:  $54,51 \pm 4,68$ ; NIT-:  $46,67 \pm 3,02$ ) e outubro (NIT+:  $54,67 \pm 3,24$ ; NIT-:  $49,91 \pm 2,05$ ), sendo as médias de NIT+

maiores que no grupo NIT-. Houve diferença ao longo dos meses em ambos os membros, porém apenas no grupo NIT- (figura 4.6).

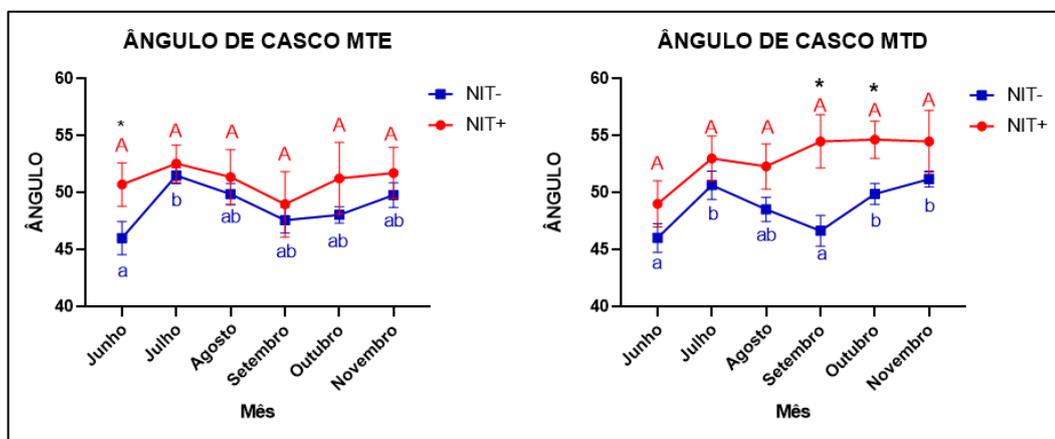


Figura 4.6. Gráficos com médias e erros padrão do ângulo de casco do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+), e asteriscos sinalizam diferença pelo teste T entre os grupos NIT- e NIT+ no respectivo mês. Em todas as análises foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

Quanto ao ângulo de rotação houve diferenças entre os grupos NIT+ e NIT- em nenhum dos membros. Houve diferença entre os meses dentro de ambos os grupos no MTE. No MTD não houve diferença entre meses em nenhum dos grupos (figura 4.7).

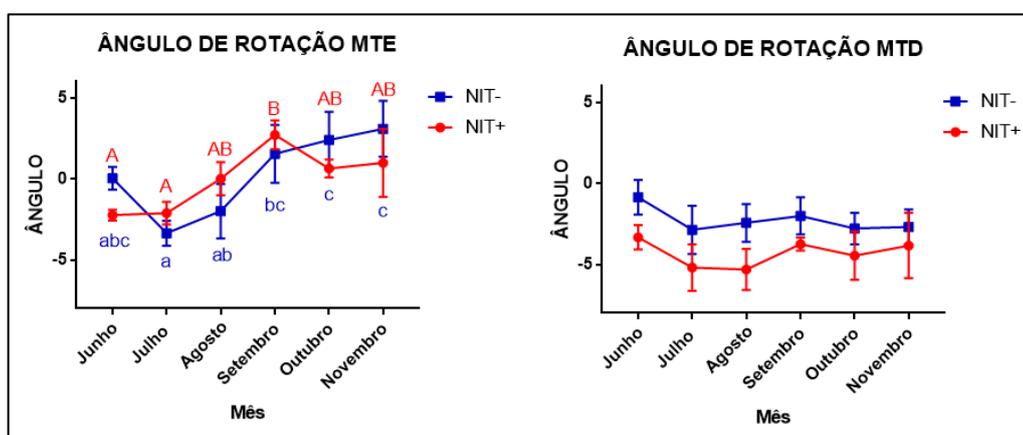


Figura 4.7. Gráficos com médias e erros padrão do ângulo de rotação do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo

lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ).

Não houve diferenças no break over entre os grupos NIT+ e NIT- em nenhum dos membros. No grupo NIT- em ambos os membros houve diferença entre os meses (figura 4.8).

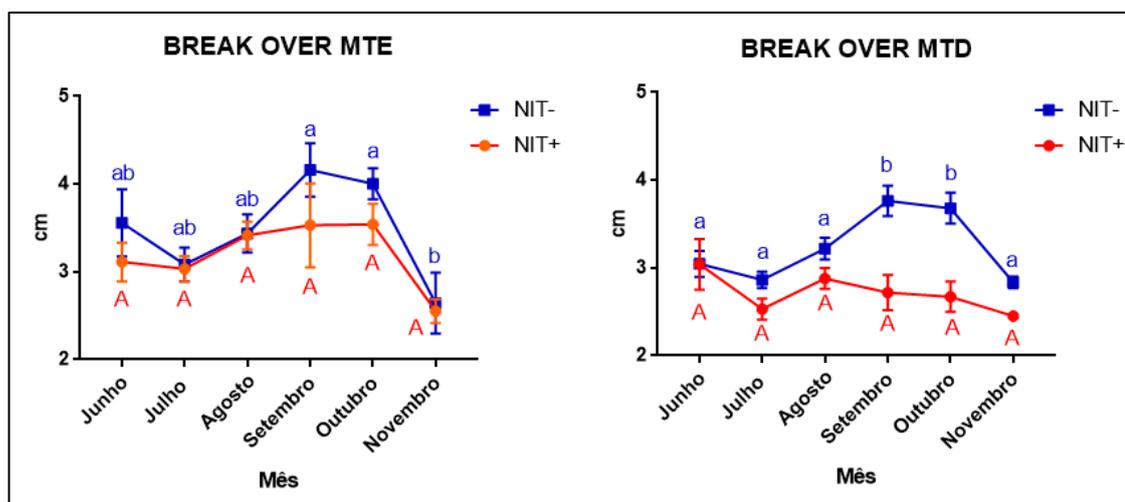


Figura 4.8. Gráficos com médias e erros padrão da distância de break over do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ).

Quanto ao afundamento, houve diferença entre os meses no grupo NIT+ do MTE, mas não nos demais. Não houve diferenças entre os grupos em nenhum dos membros (figura 4.9).

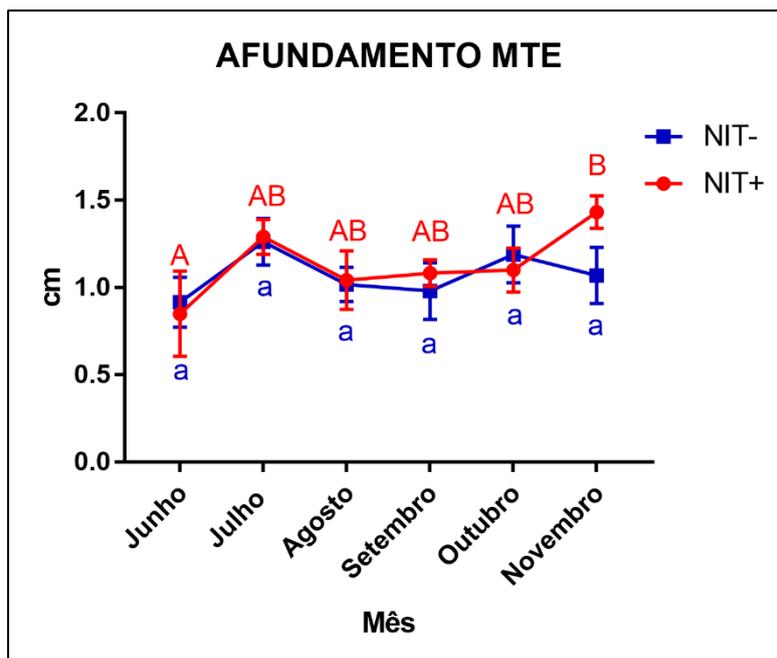


Figura 4.9. Gráficos com médias e erros padrão da distância de afundamento do membro torácico esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ).

No MTE houve diferença no ângulo palmar ao longo dos meses no grupo NIT-, mas não no NIT+ (figura 4.10). Não houve diferenças entre os grupos.

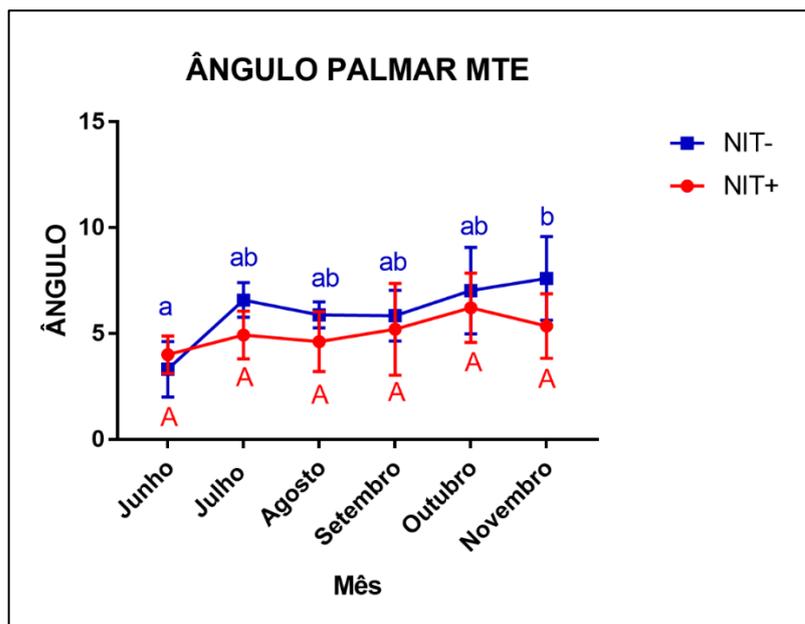


Figura 4.10. Gráfico com médias e erros padrão do ângulo palmar do membro torácico esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ).

As distâncias casco falange proximal e distal apresentaram diferenças entre meses no MTE, mas não entre grupos (figura 4.11). No MTD não houve diferenças.

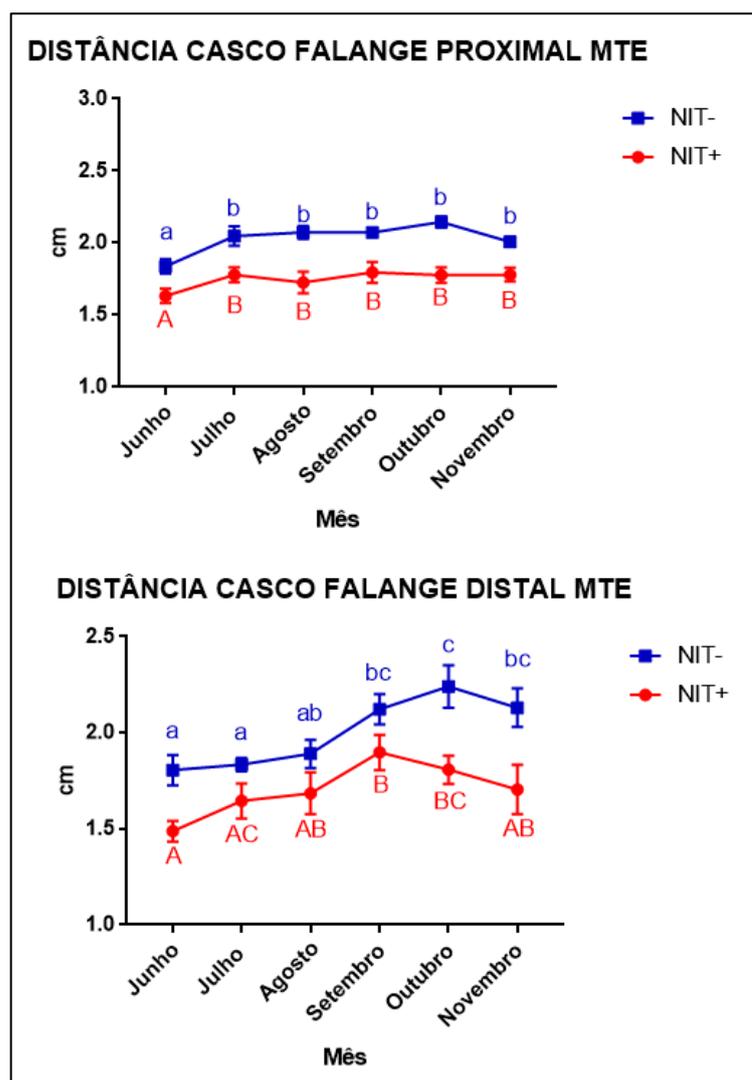


Figura 4.11. Gráficos com médias e erros padrão das distâncias casco falange proximal e distal do membro torácico esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ).

O ângulo da articulação interfalangeana proximal apresentou diferenças ao longo dos meses no MTE no grupo NIT- (figura 4.12). No MTD não houve diferenças.

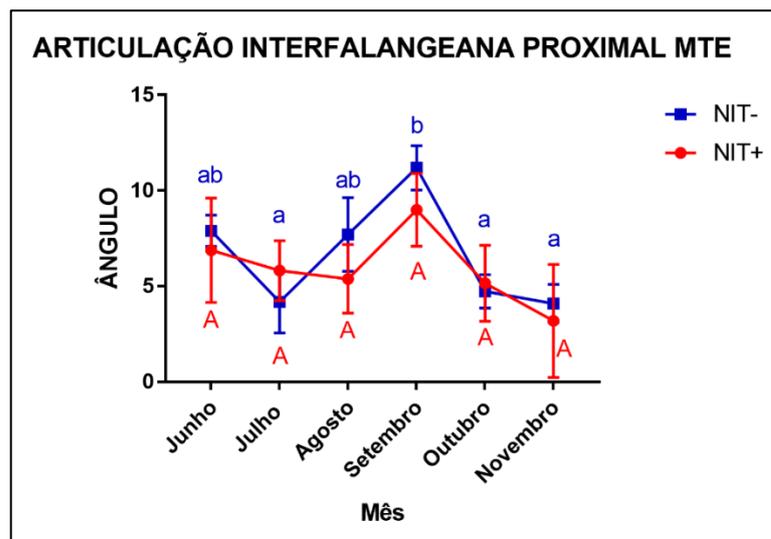


Figura 4.12. Gráfico com médias e erros padrão do ângulo da articulação interfalangeana proximal do membro torácico esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos (letras minúsculas para NIT- e maiúsculas para NIT+) ( $p < 0,05$ ).

A profundidade da sola sofreu alterações ao longo dos meses em ambos os grupos, em ambos os membros. Não houve diferenças entre os grupos (figura 4.13).

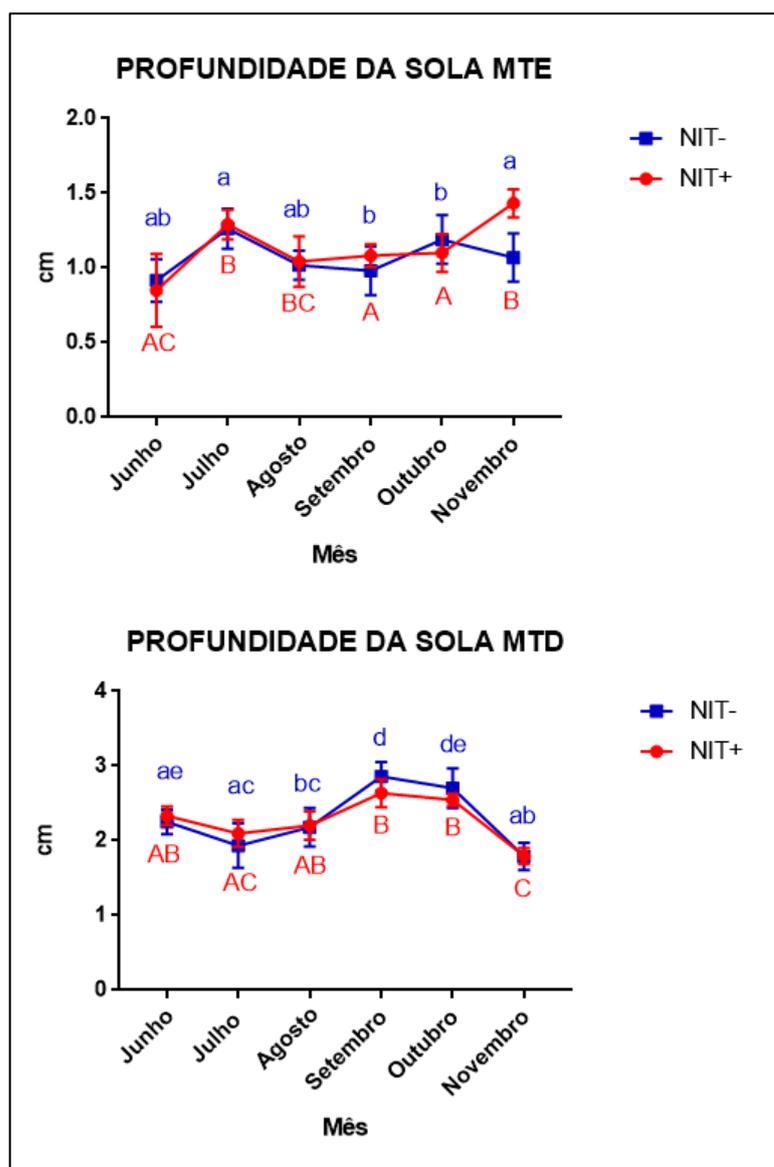


Figura 4.13. Gráficos com médias e erros padrão da profundidade da sola do membro torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de 9 equinos Mangalarga Marchador ao longo de 5 meses de dieta hipercalórica divididos em grupos com (NIT+, 4 animais) e sem (NIT-, 5 animais) estresse oxidativo/nitrosativo lamelar. Letras diferentes representam diferença pelo teste de Newman-Keuls ao longo dos meses dentro dos grupos NIT+ e NIT- ( $p < 0,05$ ).

As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas.

#### 4.4 Discussão

Sabe-se que as alterações lamelares observadas em animais com laminite endocrinopática provavelmente decorrem da expressão de sinalizadores inflamatórios, atuação de fatores de

crescimento e possivelmente a mudança do fenótipo das células epiteliais para mesenquimais, culminando na falha na conexão à membrana basal e às células vizinhas (van Eps e Burns, 2019). E o estresse oxidativo, até então considerado irrelevante na fisiopatologia da laminite ligada à SME (Burns *et al.*, 2011), atua como sinalizador do processo de transição de células epiteliais para mesenquimais, característico de estados inflamatórios crônicos, fibrose pulmonar e cancer (Cannito *et al.*, 2010). Apesar da transformação em células mesenquimais na laminite não ser completa ou idêntica à observada em células tumorais, que adquirem invasividade e motilidade (Wang *et al.*, 2013), alterações como alongamento e perda de adesão celular estão presentes na sua fisiopatologia (Patterson-Kane *et al.*, 2018). A transição de células epiteliais para mesenquimais envolve a exposição progressiva a sinalizadores (fatores de crescimento, radicais livres, citocinas e hipóxia, por exemplo) que provocam a supressão da expressão de proteínas responsáveis pela conexão intercelular, como a E-caderina, beta-catenina e integrinas (Cannito *et al.*, 2010), mecanismo similar ao observado na laminite (Black *et al.*, 2017). Considerando os achados do presente estudo, poderia-se sugerir uma relação de causa e efeito entre as alterações metabólicas decorrentes da dieta hipercalórica e obesidade, a ocorrência do estresse oxidativo/nitrosativo lamelar e as alterações histológicas e radiográficas mais pronunciadas no grupo NIT+, indicando que estes animais estariam mais propensos ao desenvolvimento da laminite endocrinopática.

A literatura descreve o alongamento das lâminas epidermais primárias e secundárias de cavalos submetidos ao modelo experimental de indução de laminite por insulina (de Laat *et al.*, 2011; de Laat *et al.*, 2012; Karikoski *et al.*, 2014), no entanto não foi o observado no presente estudo, provavelmente por não refletir as alterações histológicas da fase clínica da laminite, mas ainda prodrômica, conforme o relatado por Ribeiro (2017) ao avaliar os resultados globais destes animais. A ocorrência de menor comprimentos da LEP e da região intermediária da LES no grupo NIT+, pode sinalizar que estas alterações lamelares iniciais causadas pela dieta refletiriam, talvez, em um quadro de laminite mais grave caso estes animais a desenvolvessem. Principalmente considerando-se também os achados radiográficos e os danos ao citoesqueleto causados pelo estresse oxidativo, prejudicando a arquitetura tecidual (Keshavarzian *et al.*, 2003).

O grupo NIT+ apresentou redução do formato padrão na região abaxial da LES e aumento da HCS na região axial da LES na comparação entre tempos, mais formato afiado e menos formato

separado da região abaxial da LEP e mais forma de clava na LES intermédia comparado ao NIT- no momento final. O grupo NIT- teve aumento da HCS na região abaxial e redução do formato padrão e aumento de HCS e formato bifurcado na região axial da LES na comparação entre tempos. O formato bifurcado na região axial da LES também foi maior em NIT- comparado a NIT+ no momento final. A variabilidade de formatos obtidos em ambos os grupos concorda com os resultados de Kawasako *et al.* (2009), que estabeleceram as classificações utilizadas e relataram grande diversidade de formatos, resultante da junção entre LEP e LES, o que não teria significado clínico visto que os animais utilizados eram sadios.

As alterações observadas quanto ao ângulo da articulação interfalangeana distal, ângulo de casco e suporte de casco podem ter sofrido vieses relacionados ao casqueamento realizado durante o período experimental. Já o afundamento, que não sofre interferência deste fator, apresentou um resultado significativo, com aumento de forma mais acentuada ao longo dos meses no grupo NIT+. Além disso, todos os animais apresentaram anéis divergentes nos cascos ao final do período experimental, refletindo modificações do estojo córneo como efeito da dieta (Ribeiro, 2017). Provavelmente os animais NIT+, apesar de não apresentarem claudicação (Ribeiro, 2017), sofreram mudanças nas relações entre o casco e a falange distal que os tornaram mais suscetíveis ao desenvolvimento de laminite endocrinopática comparado ao grupo NIT-. Trabalhos prévios demonstraram alterações radiográficas de cascos, como aumento do afundamento, em animais obesos mesmo sem claudicação ou sinais clínicos de laminite (Magalhães *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2017), e Mullard *et al.* (2020) reportaram correlação negativa entre a distância casco-falange e razão altura: peso corpóreo em animais com claudicação. Como os animais do grupo NIT- também apresentaram alterações radiográficas ao longo dos meses, o presente trabalho reforça a influência negativa da dieta e obesidade na saúde dos cascos, porém demonstrando que alguns indivíduos são mais suscetíveis, o que pôde ser interpretado também a partir dos resultados de Meier *et al.* (2018) que submeteram pôneis com desregulação insulínica a um desafio de carboidratos por 18 dias, obtendo uma taxa de apenas 38% de animais com laminite dentro deste período.

Alguns parâmetros radiográficos (afundamento, ângulo palmar, distância casco falange e articulação interfalangeana proximal) apresentaram diferenças apenas no membro torácico esquerdo. Este achado poderia estar relacionado à biópsia de casco inicial, que foi realizada no MTE em todos os animais. No entanto, nenhum dos animais apresentou sinais clínicos de

laminite ao longo dos meses do estudo (Ribeiro, 2017). Um período experimental mais longo poderia, provavelmente, diluir o possível efeito da biópsia de cascos.

As alterações descritas neste capítulo corroboram com a hipótese descritas nos capítulos anteriores de que a marcação por 3-nitrotirosina nas lâminas dos cascos em parte dos animais estudados é resultado de uma maior susceptibilidade dos mesmos à SME e laminite endocrinopática, o que pode ser evidenciado por alterações mais acentuadas no grupo NIT+. Alterações radiográficas e histológicas mais evidentes e o desenvolvimento de laminite talvez fossem observados se a dieta se prolongasse por um período maior.

#### **4.5 Conclusão**

Considerando equinos de mesma raça submetidos ao mesmo manejo e à mesma dieta hipercalórica rica em carboidratos estruturais, o estresse oxidativo/nitrosativo lamelar ocorreu no grupo que também apresentou de forma exclusiva perda da relação espacial entre estojo córneo e falange distal (aumento da distância de afundamento) e alteração morfométrica do tecido lamelar (redução do comprimento das lâminas epidermais secundárias). Tais achados indicam que o estresse oxidativo/nitrosativo lamelar é fator preponderante no desenvolvimento da laminite endocrinopática e que pode ser indicador de equinos com maior susceptibilidade a desenvolver esta doença em equinos submetidos a dieta hipercalórica.

#### **4.6 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, n. 3, p. 530-535, 2007.

BLACK, S. J., WANG, L., PAWLAK, E., *et al.* Role of proteases in laminitis. In: Belknap, J. K., Geor, R. J. (Eds.). *Equine Laminitis*. John Wiley & Sons, 2017a, p. 115-133.

BURNS, T. A., WESTERMAN, T., NUOVO, G. J., *et al.* Role of oxidative tissue injury in the pathophysiology of experimentally induced equine laminitis: a comparison of 2 models. *Journal of veterinary internal medicine*, v.25, n. 3, p. 540-548, 2011.

CANNITO, S., NOVO, E., DI BONZO, L. V., *et al.* Epithelial–mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. *Antiox. Redox Sign.*, v. 12, n. 12, p. 1383-1430, 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. Path.*, v. 145, n. 4, p. 399-409, 2011.

DE LAAT, M. A., SILLENCE, M. N., MCGOWAN, C. M., POLLITT, C. C. Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinaemia and lamellar histopathology in Standardbred horses. *The Vet. J.*, v. 191, n. 3, p.317-322, 2012.

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., FRANK, N., MCGOWAN, C. M., *et al.* ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *J. Vet. Intern. Med.*, 33(2), 335-349, 2019.

HENNEKE, D. R., POTTER, G., KREIDER, J. L. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, v. 21, n. 6, p. 897-909, 1984.

KARIKOSKI, N. P., PATTERSON-KANE, J. C., ASPLIN, K. E., *et al.* Morphological and cellular changes in secondary epidermal laminae of horses with insulin-induced laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 75, n. 2, p. 161-168, 2014.

KESHAVARZIAN, A., BANAN, A., FARHADI, A., *et al.* Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, v.52, n. 5, p.720-728, 2003.

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.

LASKOSKI, L. M., DITTRICH, R. L., VALADÃO, C. A. A., *et al.* Oxidative stress in hoof lamellar tissue of horses with lethal gastrointestinal diseases. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 171, p. 66-72, 2016.

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. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 66, n. 4, p. 1023-1032, 2014.

MAGALHÃES, J. F., LIMA, L. R., PAZ, C. F., *et al.* Spatial relationship between the distal phalanx and the hoof capsule in young Campolina mares with and without obesity. *Pesq. Vet. Bras.*, v.37, n.9, p.1025-1031, 2017.

MCCUE, M. E., GEOR, R. J., SCHULTZ, N. Equine metabolic syndrome: a complex disease influenced by genetics and the environment. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 35, n. 5, p.367-375, 2015.

MEIER, A. D., DE LAAT, M. A., REICHE, D. B., *et al.* The oral glucose test predicts laminitis risk in ponies fed a diet high in nonstructural carbohydrates. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 63, p. 1-9, 2018.

MILES, J., GLASSCOCK, R., AIKENS, J., *et al.* A microfluorometric method for the determination of free fatty acids in plasma. *J. Lipid Res.*, v.24, n. 1, p. 96-99, 1983.

MULLARD, J., IRELAND, J., DYSON, S. Radiographic assessment of the ratio of the hoof wall distal phalanx distance to palmar length of the distal phalanx in 415 front feet of 279 horses. *Equine Vet. Educ.*, v. 32, p. 2-10, 2020.

PATTERSON-KANE, J. C., KARIKOSKI, N. P., MCGOWAN, C. M. Paradigm shifts in understanding equine laminitis. *Vet. J.*, v. 231, p. 33-40, 2018.

RIBEIRO, R. M., MENDES, H. M., VALADARES, R. C., *et al.* A novel equine hoof lamellar tissue biopsy technique. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 49, p. 63-68, 2017.

RIBEIRO, R. M. Relação entre obesidade induzida e laminite endocrinopática em equinos Mangalarga Marchador: aspectos clínicos, laboratoriais, morfométricos e patológicos. 2017, 154f. Tese (Doutorado em Medicina e Cirurgia Veterinárias). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TREIBER, K. H., KRONFELD, D. S., HESS, T. M., *et al.* Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 228, n.10, p. 1538-1545, 2006a.

TREIBER, K. H., KRONFELD, D. S., GEOR, R. J. Insulin resistance in equids: possible role in laminitis. *J. Nutr.*, v. 136, pp. 2094S-20985S, 2006b.

VAN EPS, A. W., BURNS, T. A. Are there shared mechanisms in the pathophysiology of different clinical forms of laminitis and what are the implications for prevention and treatment?. *Vet. Clin. Equine*, v. 35, n. 2, p. 379-398, 2019.

WANG, L., PAWLAK, E. A., JOHNSON, *et al.* Impact of laminitis on the canonical Wnt signaling pathway in basal epithelial cells of the equine digital laminae. *PLoS One*, v. 8, n. 2, e56025, 2013.

### **Considerações Gerais**

As conclusões desta tese evidenciam o quão precoce e relevantes são as alterações que ocorrem no metabolismo de equinos submetidos a uma dieta desequilibrada, com excesso de energia e carboidratos não estruturais. Cavalos submetidos a indução de obesidade por meio desta dieta se comportaram de forma diferente perante o desafio. Quase metade destes animais desenvolveram estresse oxidativo/nitrosativo lamelar caracterizado pela imunomarcagem com 3-nitrotirosina ao final do período experimental. Provavelmente por uma relação de causa e efeito, estes mesmos animais apresentaram alterações de indicadores de desregulação insulínica e laminite endocrinopática mais acentuadas que os demais. Considerando o exposto, este trabalho contribui significativamente para a pesquisa da síndrome metabólica equina ao mostrar de forma pioneira a ocorrência de estresse oxidativo/nitrosativo lamelar associado à desregulação insulínica, levantar a possibilidade do envolvimento do estresse oxidativo/nitrosativo lamelar e do IGF-1 na fisiopatologia da síndrome metabólica e da laminite endocrinopática equina. Adicionalmente, verifica-se o potencial da utilização da 3-nitrotirosina lamelar e do IGF-1 sérico como indicadores de maior susceptibilidade de alguns indivíduos ao desenvolvimento de desequilíbrios metabólicos e alterações lamelares relacionadas à síndrome metabólica equina.