

# REVISTA PORTUGUESA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



REVISTA  
DE  
**MEDICINA VETERINARIA**

Orgão da Sociedade Portuguesa de Medicina Veterinaria

**Propriedade** Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias

**Fundador** J.V. Paula Nogueira

**Editor** Maria dos Anjos Pires

**Coeditor** João Requicha

**Volume 115**

**N.º 613-614**

**Ano 2020**

Propriedade  
**Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias**

Fundador  
**J.V. Paula Nogueira**

Editor  
**Maria dos Anjos Pires**

Coeditor  
**João Filipe Requicha**

Contatos  
**Faculdade de Medicina Veterinária**  
**Pólo Universitário do Alto da Ajuda, Sala C3.66**  
**Av. da Universidade Técnica**  
**1300-477 Lisboa - Portugal**

+351 213 580 221/2  
**@ spcv.pt@gmail.com**

**http://www.spcv.pt/**

Publicidade  
**Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias**

Subsídios



**Fundação para a Ciência e a Tecnologia**

Design gráfico  
**Nelson Ribeiro**

É permitida a reprodução do conteúdo desta revista  
*The reproduction of the content of this publication is permitted*

Desejamos estabelecer permuta com outras publicações  
*We wish to establish exchange with other publications*

Os trabalhos submetidos para publicação são analisados por especialistas  
*Papers submitted for publication are peer reviewed*

**ISSN 0035-0389**

A Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias está inscrita na Direção-Geral da Comunicação Social sob o registo n.º 105 080 e a sua proprietária, Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, sob o n.º 205 079

## Índice

Editorial.....	3
Gestação e Síndrome Metabólica Equina: caracterização e diagnóstico .....	4
Técnicas para avaliação da eficiência da cultura in vitro de folículos ovarianos de ruminantes .....	13
Supplementation with corn silage improves index and body condition while not affecting first third of gestational status in mares .....	23

## Editorial

Há mais de cem anos, 33 médicos veterinários conseguiram realizar o sonho, há muito desejado, de constituir “uma agremiação [...] para bem cuidarem dos seus interesses morais e materiais”. Nascia, assim, a Sociedade Portuguesa de Medicina Veterinária em 10 de outubro de 1902 que, passados 50 anos, dava origem à atual **Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias (SPCV)**.

Em todos os aniversários da SPCV a que assisti, com orgulho ouvi os seus diferentes Presidentes referir ser esta a “Sociedade Científica em Portugal com mais anos de atividade continuada e com uma publicação científica publicada de forma ininterrupta, mesmo durante as duas Grandes Guerras Mundiais.”

A **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias (RPCV)** foi um dos grandes objetivos dos seus fundadores, principalmente de Paula Nogueira, o seu primeiro Editor. Esta publicação teve o seu primeiro número em março de 1902. Contava, na altura, com um Secretário, um Administrador-redator e um Conselho de Redação com 13 elementos. A Revista servia, para toda a comunidade médico-veterinária, como “rede social” em que se divulgavam os artigos científicos, sinopses de livros técnicos e didáticos, relatos de alguns acontecimentos relevantes da vida Social e Profissional, bem como notas de seminários, reuniões e congressos. Era, na sua essência, o ponto de ligação entre toda a classe Médico-Veterinária.

Pertencer à SPCV e ter um artigo publicado na RPCV era um orgulho para todos nós!

A SPCV foi fundamental em todo o percurso da vida Médico Veterinária Portuguesa, durante os últimos mais de 100 anos, e a prova está na colaboração na criação do Sindicato Nacional dos Médicos Veterinários, em 1944, e da Ordem dos Médicos Veterinários, em 1991.

Nos últimos anos, a SPCV e a RPCV têm vindo a perder protagonismo no seio da classe Veterinária, com a natural emergência da Ordem, de outras sociedades técnico-científicas e outras publicações muitas vezes de mais fácil acesso e leitura. Mesmo assim, manter viva a SPCV e, principalmente, a RPCV é o nosso principal objetivo!

Esta atividade, em simultâneo com as atividades do dia-a-dia não é fácil e, por isso, a partir deste número, contamos com a colaboração do **Coeditor Prof. João Requicha**. Desta colaboração surgem inovações, nomeadamente uma nova capa (neste número com uma fotografia da capa do histórico número 1 da revista), a criação de novas tipologias de artigos publicados, incluindo resumos gráficos e, também, estimular os colegas mais novos a publicar os trabalhos das suas Dissertações e Teses.

Por fim, uma palavra muito especial a todos os colegas que contribuem de alguma forma para a revisão dos artigos, mantendo assim a qualidade científica dos mesmos. Sabendo que é um esforço adicional à vossa atividade diária, só me resta dirigir-vos um profundo **muito obrigada!**

A Editora,  
**Maria dos Anjos Pires**

## Gestação e Síndrome Metabólica Equina: caracterização e diagnóstico

### Pregnancy and Equine Metabolic Syndrome: characterization and diagnosis

Fernanda Jordão Affonso<sup>1</sup>, Maria Augusta Alonso<sup>1</sup>, Claudia Barbosa Fernandes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

**Resumo:** Uma epidemia de obesidade na população equina vem acontecendo em todo mundo como consequência da diminuição da demanda de exercício, melhora da qualidade das forragens, aumento da oferta de concentrado e menores perdas de energia promovendo balanço energético positivo ao longo do ano. A obesidade e aumento da adiposidade regional juntamente com resistência à insulina e hiperinsulinemia formam os componentes principais da chamada Síndrome Metabólica Equina (SME), que traz consequências na reprodução, nos poldros nascidos de éguas portadoras da SME, além de poder acarretar em laminite e óbito. O objetivo desse trabalho é revisar as principais características da SME e sua relação com a gestação equina.

**Summary:** An epidemic of obesity in the equine population has been occurring throughout the world as a consequence of reduced exercise, improved forage quality, increased use of concentrated feed and decrease of energy loss promoting positive energy balance throughout the year. Obesity increased regional adiposity along with insulin resistance and hyperinsulinemia are the main components of the so-called Equine Metabolic Syndrome (EMS), which has consequences in several systems of the organism, including fertility problems, consequences in foals born from mares with EMS, besides the risk of laminitis and death. The aim of this paper is to review the main characteristics of SME and their relationship with equine pregnancy.

\*Correspondência: fernandescb@usp.br

#### Introdução

De acordo com Sillence (2012), uma epidemia de obesidade em equinos está acontecendo em todo mundo, muito similar àquela que ocorre em humanos. A combinação da diminuição do trabalho, melhora da qualidade das forragens, aumento da oferta de concentrado e as medidas para limitar as perdas de energia pela termorregulação causam um balanço energético positivo ao longo do ano (Argo *et al.*, 2012). A resultante epidemia de obesidade apresenta um grande problema de bem estar, sendo indiretamente um fator de risco para a ocorrência da resistência à insulina (RI), ou seja, uma falha da insulina em sinalizar a captação de glicose pelos tecidos sensíveis e diretamente, um limitante para o desempenho reprodutivo e atlético dos animais (Argo *et al.*, 2012; de Laet *et al.*, 2014).

A RI, juntamente com obesidade, aumento da adiposidade regional e hiperinsulinemia formam os componentes principais da chamada Síndrome Metabólica Equina (SME), acompanhadas de dislipidemia, inflamação sistêmica, alteração nas concentrações sanguíneas de adipocinas e hipertensão arterial (Frank, 2011). Esta condição se assemelha à síndrome metabólica em humanos, que é associada com aumento no risco de doenças cardiovasculares e possivelmente diabetes *mellitus* tipo 2 (McCue *et al.*, 2015).

A SME é recente, foi aceita pela primeira vez como um problema na saúde dos animais obesos e/ou difíceis de perder peso, conhecidos como “easy keepers” por Johnson (2002). Alguns estudos, como de Bamford *et al.* (2014) e Adams (2012), apontam a presença de uma base genética para o fenótipo de SME, uma vez que pôneis, e certas raças de cavalos (Morgan, Paso Fino, Mustangue, Andaluz, Quarto de Milha e Árabes) são mais afetadas e outras não parecem predispostas. Evidências sugerem que animais de meia idade (5-14 anos) são mais afetados.

Métodos práticos e utilizáveis a campo são fundamentais para o diagnóstico e tratamento desta condição, que causa consequências em diversos sistemas do organismo, podendo levar à problemas de fertilidade em éguas e garanhões, maior risco de distocias, aumento da chance de ocorrer doenças ortopédicas e deformidades angulares em poldros provenientes de éguas com SME e laminite culminando em óbito (Sillence *et al.*, 2006; Brown-Douglas e Huntington, 2011; Sillence, 2012).

A gestação é uma condição fisiológica que por si já afeta a sensibilidade à insulina e o metabolismo da glicose, durante a qual ocorrem mudanças adaptativas que preparam o organismo para as demandas placentárias e de crescimento fetal (Butte, 2000). No início a sensibilidade à insulina pode continuar a mesma ou, em indivíduos que são resistentes à insulina, pode aumentar ligeiramente. Com o progresso da prenhez, a resposta da insulina à glicose aumenta enquanto a sensibilidade à insulina no corpo como um todo diminui, o que é provavelmente um mecanismo adaptativo que retarda a remoção da glicose para os tecidos maternos visando garantir o suprimento suficiente para os tecidos feto placentários glicose-dependentes (George *et al.*, 2011). Esta RI fisiológica da gestação facilita o suprimento de glicose

para o feto por meio de uma troca na utilização de substrato no tecido materno, de carboidrato para ácidos gordos e da diminuição na utilização de glicose pelos tecidos periféricos (Hoffman *et al.*, 2003).

Nesse período, a sensibilidade das células pancreáticas à glicose aumentada pode resultar em hiperinsulinemia (Fowden *et al.*, 1984), permitindo que tanto os requerimentos fetais quanto maternos sejam atingidos sem induzir hipoglicemia. Após os 270 dias, o feto ganha aproximadamente 45% do peso final ao nascimento e conseqüentemente tem uma alta demanda de glicose. A captação uterina de glicose remove 75% dessa demanda da circulação materna. O uso da glicose pela mãe é então reduzido a um nível mínimo visando permitir a transferência para o feto em desenvolvimento (Morresey, 2013). As concentrações de insulina e sensibilidade das células pancreáticas à glicose também são reduzidas em comparação com a gestação mais precoce (Simmons *et al.*, 1979).

Apesar dessa alteração aparentemente fisiológica durante o terço final da gestação, a dieta materna pode alterar mais profundamente as dinâmicas de insulina e glicose (George *et al.*, 2009). Éguas prenhes são frequentemente alimentadas com dietas altamente energéticas, em grande parte composta por carboidratos solúveis durante a gestação para maximizar o desenvolvimento fetal (Coverdale *et al.*, 2015).

Éguas com RI latente antes da gestação, apresentam estresse metabólico adicional aumentando o risco de desenvolver laminite (Galantino-Homer e Engiles, 2012). Além disso, não se sabe ao certo os efeitos da RI na gestação. Em humanos, diabetes gestacional, abortamento e comprometimento fetal são reportados (Morresey, 2013). Desta forma, fica evidente a importância de determinar a resposta de insulina durante a gestação equina e a possível existência de correlação desta com o desenvolvimento posterior da SME e/ou laminite em éguas reprodutoras (Galantino-Homer e Engiles, 2012).

O manejo inapropriado da nutrição materna durante a gestação pode modificar o desenvolvimento fetal inicial, gerando possíveis conseqüências a longo prazo, como predisposição do poldro à desordens metabólicas, entre elas, a RI (George *et al.*, 2009). George *et al.* (2009), observaram que mecanismos determinantes das concentrações basais de insulina e glicose em poldros podem ser afetados pela dieta materna, encontrando maiores concentrações de glicose e insulina em poldros nascidos de éguas recebendo dieta rica em amido quando comparado com os de éguas recebendo dieta pobre em amido no terço final da gestação. A diferença foi observada aos 80 dias de vida dos poldros, quando as éguas já recebiam a mesma dieta. Isso pode indicar um efeito no desenvolvimento fetal do fígado, pâncreas e mecanismos neurais impactando a homeostase ou secreção de insulina.

Além disso, o ambiente materno exerce ação sobre o genótipo fetal, contribuindo ativamente para as características pós natais do poldro como altura, peso,

conformação corporal, resposta imune, metabolismo energético, *status* osteoarticular e funções tireoideanas, adrenais e cardiovasculares (Fernandes *et al.*, 2014; Peugnet *et al.*, 2016). Essas alterações fenotípicas dos poldros causadas por fatores ambientais, incluindo nutrição, quando ocorrem em períodos críticos do desenvolvimento inicial são definidas como programação de desenvolvimento e podem levar à anormalidades no animal adulto (Coverdale *et al.*, 2015).

Alguns estudos (George *et al.*, 2009; Hammer *et al.*, 2011) indicam que quando a nutrição materna é alterada via suplementação com concentrado, maiores concentrações de insulina são necessárias para manter concentrações sanguíneas similares de glicose na égua e isso pode levar a programação metabólica do poldro. Alguns autores ainda sugerem que a condição *easy keeper* pode resultar dessa programação metabólica intra útero (Satterfield *et al.*, 2010).

Visto as conseqüências da SME na saúde e qualidade de vida dos animais, assim como a possível influência das suas alterações na gestação e formação do poldro, o objetivo desse trabalho é revisar as principais características da SME e sua possível relação com a gestação equina.

## Caracterização

### **Resistência à Insulina**

A RI é a característica central e uma das causas patofisiológicas primárias da SME (Bertin e Sojka-Kritchevsky, 2013; de Laat *et al.*, 2014), ocorrendo insensibilidade da superfície celular e várias desordens no interior das células sensíveis à insulina, ou seja, em tecido muscular, adiposo e hepático (Kronfeld *et al.*, 2005). Como conseqüência, a glicose não pode ser eficientemente removida da circulação sanguínea pelos tecidos, podendo resultar em hiperglicemia (De Graaf-Roelfsema, 2014). A RI pode ser causada por diminuição na secreção pancreática de insulina em resposta à glicose sanguínea, redução na função dos receptores de insulina nos tecidos sensíveis ou uma combinação de ambos envolvendo defeitos em diferentes passos na via de sinalização da insulina (Firshman e Valberg, 2007; Bertin e Sojka-Kritchevsky, 2013). Fatores que interferem na ação da insulina levam à intolerância à glicose e, por conseqüência ao aumento na estimulação das células  $\beta$  do pâncreas, podendo causar hiperinsulinemia e hiperglicemia (Johnson *et al.*, 2004).

### **Hiperinsulinemia e Hiperglicemia**

Em indivíduos normais, a liberação de insulina responde à ingestão de glicose de maneira dose dependente e suas concentrações diminuem 3 horas depois da alimentação com feno e concentrado (Waldhaus, 1989; Crandell *et al.*, 1999). Seguindo o aumento da absorção de glicose, seus níveis plasmáticos aumentam e estimulam a secreção de

insulina pelo pâncreas. Tanto a hiperglicemia quanto a hiperinsulinemia suprimem a produção de glicose hepática e estimulam a captação de glicose pelo fígado, gordura e músculo visando reestabelecer a normoglicemia (De Graaf-Roelfsema, 2014).

A secreção de insulina insuficiente em resposta à hiperglicemia, primária, como ocorre na diabetes tipo 1 é rara em cavalos (Johnson, 2002). A falha secundária é proposta na SME como um resultado da diminuição da sensibilidade tecidual à insulina podendo levar a altos níveis persistentes de glicose sanguínea e subsequente exaustão pancreática (Firshman e Valberg, 2007). No entanto, em cavalos afetados, a magnitude da hiperglicemia resultante da RI costuma ser moderada porque um aumento na secreção de insulina, ou seja, hiperinsulinemia, parece compensar sua ação reduzida (Johnson *et al.*, 2004). Essa compensação ocorre em geral, pelo aumento tanto da secreção da insulina pelas células  $\beta$  individualmente quanto da quantidade de células  $\beta$  presentes no pâncreas, além da redução do *clearance* de insulina pelo fígado. Essa redução já foi observada em cães, humanos e cavalos com hiperinsulinemia. O resultado é uma hiperinsulinemia associada com normoglicemia (Durham *et al.*, 2008; De Graaf-Roelfsema, 2014).

### Hiperlipidemia

A elevação nas concentrações de ácidos gordos livres plasmáticos causa RI no músculo e no fígado e tem um impacto negativo na secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas (Akbari *et al.*, 2015). A relação entre a elevação nos ácidos gordos não esterificados (AGNE) circulantes e o aumento da RI foi demonstrada em vacas de leite (Pires *et al.*, 2007), gatos (Nishii *et al.*, 2012), cães (Chiu *et al.*, 2009), ovelhas (Akbari *et al.*, 2015) e cavalos (Tadros *et al.*, 2013).

Os valores normais de ácidos gordos não esterificados (AGNE) em cavalos permanecem desconhecidos, porém em muitos estudos, os valores determinados para cavalos em jejum não excedem 0,05 mmol/L (Frank *et al.*, 2002; Kedzierski e Kowalik, 2009). Kedzierski *et al.* (2011), avaliando éguas recém paridas obtiveram valores muito maiores do que os relatados como referência.

A insulina é um hormônio anabólico, conhecido por suprimir a quebra dos triglicérides no tecido adiposo. A RI estimula a hidrólise dos triglicérides resultando em subsequente aumento no AGNE circulante, sendo sua concentração um indicador da degradação de lipídeos no tecido adiposo (Aoki e Ishii, 2012; Auyyuenyong *et al.*, 2018). Estudos demonstram que éguas gestantes, quando comparadas a não gestantes, apresentam maiores níveis de AGNE (Watson *et al.*, 1993; Kedzierski *et al.*, 2008).

O aumento das concentrações de triglicérides em terço final reflete o catabolismo materno e parece ser um achado normal da gestação, já relatado por Harvey *et al.*, 2005 em éguas em gestação média e tardia com redução após o parto, por Smith *et al.*, 2017 dos 241 aos 300 dias da gestação e em humanos e ratos próximos ao nascimento (Laborde *et al.*, 1999). A

transferência de lipídeos (principalmente triglicérides) pela placenta para o crescimento fetal e para a glândula mamária, visando transferir gordura para ao leite podem induzir a lipólise, ocasionando em transporte de AGNE para o fígado, aumentando a síntese hepática de triglicérides e a superprodução de VLDL (*very low density lipoprotein*, Watson *et al.*, 1993; Arfuso *et al.*, 2016). Sabe-se que a RI nos músculos e no tecido adiposo em humanos leva à sobrecarga de ácidos gordos livres no fígado, causando um aumento na síntese de triglicérides e VLDL nos hepatócitos (Ertelt *et al.*, 2014), além de que cavalos e pôneis afetados pela SME normalmente sofrem de hipertrigliceridemia, sendo este um preditor significativo de laminite, com os valores de corte para pôneis estando entre 57-94 mg/dL.

Os perfis lipídicos anormais podem contribuir para alteração na sinalização celular ou aumento na inflamação (Elzinga *et al.*, 2015). Em indivíduos obesos, adipócitos necróticos levam ao recrutamento de leucócitos no tecido adiposo, onde os monócitos se tornam macrófagos pró-inflamatórios ativados, que localizados em torno dos adipócitos compreendem a fonte primária das citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral  $\alpha$ : TNF $\alpha$ ; interleucinas: IL1 $\beta$ , IL6 e IL12), coordenando a RI (Peluso e Palmery, 2015).

### Obesidade e Adiposidade Regional

Estudos relatam incidência de mais de 50% de obesidade na população equina (Coverdale *et al.*, 2015). Ela está associada com atividades metabólica e reprodutiva alteradas (Carter *et al.*, 2009a; Burns *et al.*, 2010), risco de laminite e sensibilidade à insulina reduzida. Powell *et al.* (2002) mostraram que a taxa de eliminação de glicose foi marcadamente reduzida em éguas obesas em comparação com éguas magras indicando sensibilidade à insulina reduzida.

Apesar disso, a obesidade não vem mais sendo vista como uma causa da SME, tratando-se no entanto, de uma característica comumente associada, que quando presente pode exacerbar a desregulação insulínica (Bamford *et al.*, 2014; McCue *et al.*, 2015; Durham *et al.*, 2019).

Obesidade em cavalos é definida usando um sistema de *score* de condição corporal (CC) padronizado por Henneke *et al.* (1983), no qual uma gama de descritores anatômicos graduados são avaliados, obtendo-se uma pontuação subjetiva que varia de 1 a 9 (magro a obeso), sendo considerados obesos animais com CC  $\geq 7$  (Henneke *et al.*, 1983; Adams, 2012; Dugdale *et al.*, 2012). Alguns autores consideram que a utilização apenas do sistema de CC pode ser um indicador pobre de teor de gordura e perda de peso em cavalos (de Laet, 2013).

Em cavalos e pôneis, vem sendo proposto que o tecido adiposo distribuído especificamente na crista do pescoço pode indicar ou contribuir para a hiperinsulinemia, RI e risco de laminite (Carter *et al.*, 2009b). O tamanho de crista de pescoço e gordura excessiva nessa área pode ser altamente responsável pela inflamação sistêmica persistente que está

presente em cavalos e pôneis com SME (Divers, 2010). Carter *et al.* (2009a) descreveram um sistema padronizado de *score* para mensurar a adiposidade na crista do pescoço em equídeos.

Frank *et al.*, (2006) reportaram que cavalos obesos com RI apresentaram maiores médias dos *scores* de circunferência de pescoço (SCP) do que éguas não obesas, relatando que essa morfologia muda com o *status* de sensibilidade à insulina e condição corporal. No trabalho de Dugdale *et al.* (2011), alterações nas circunferências abdominal e torácica foram considerados índices mais precisos de aumento da massa corpórea e CC do que o SCP. No entanto, maiores estudos epidemiológicos são necessários para quantificar melhor a associação entre CC e doenças relacionadas à obesidade (Dugdale *et al.*, 2012).

### Papel do tecido adiposo

Historicamente, o tecido adiposo branco era considerado relativamente inerte metabolicamente, funcionando como um depósito de gordura. No entanto, com a descoberta e descrição da leptina, hormônio derivado do tecido adiposo em 1995, o tecido adiposo branco vem sendo reconhecido como altamente ativo metabolicamente, e endocrinologicamente importante na regulação do metabolismo (Burns *et al.*, 2010).

Atualmente o tecido adiposo é reconhecido como o maior órgão endócrino do corpo, secretando uma grande variedade de moléculas imunomoduladoras (adipocinas) que desempenham um papel importante na regulação da fisiologia vascular, imunológica e metabólica, entre elas leptina, resistina, angiotensinogênio, adiponectina, TNF $\alpha$  e muitas interleucinas (IL-6 e IL-10, por exemplo) (Chaldakov *et al.*, 2003; Geor e Frank, 2009).

A leptina é primariamente produzida e secretada pelo tecido adiposo em níveis proporcionais à condição corporal e sua secreção é estimulada pela insulina e inversamente relacionada com a sensibilidade à insulina em cavalos obesos (Carter *et al.*, 2009b). Sua secreção pelos adipócitos parece ser afetada por vários outros hormônios incluindo insulina, hormônio do crescimento (GH), glicocorticoides, epinefrina, prolactina e hormônios da tireoide (Cartmill *et al.*, 2003).

Em muitas espécies, incluindo humanos, as concentrações de leptina estão elevadas durante a gestação, como resultado do aumento da síntese pelo tecido materno, estimulada pelas concentrações de estrógeno, além da leptina produzida pelo feto e pela placenta (Heidler *et al.*, 2003; Henson e Castracane, 2006; Yilmaz *et al.*, 2010; El-Dorf *et al.*, 2016). Em éguas, concentrações mais altas de leptina foram encontradas nas últimas semanas de gestação, diminuindo após o parto e então estabilizando (Berg *et al.*, 2007; Romagnoli *et al.*, 2007; Huff *et al.*, 2008; Fradinho *et al.*, 2014).

No entanto, alguns trabalhos não relatam este padrão (Heidler *et al.*, 2003; Arfuso *et al.*, 2016; Smith

*et al.*, 2017). Avaliando toda a gestação Smith *et al.*, 2017 observaram aumento apenas do 181 aos 240 dias de gestação (2,9 ug/L  $\pm$  0,27).

Com o aumento da obesidade, o tecido adiposo parece adotar um fenótipo inflamatório distinto, caracterizado por um aumento na expressão gênica e secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL-6) e quimiocinas (Burns *et al.*, 2010). Em humanos e modelos experimentais de obesidade como roedores, o tecido adiposo (particularmente depósitos viscerais) expressa maiores concentrações dessas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em indivíduos resistentes à insulina (Burns *et al.*, 2010).

Estudos prévios demonstraram correlação positiva do CC com a espessura de gordura subcutânea, concentração plasmática de leptina, expressão gênica de citocinas inflamatórias e resistência periférica à insulina, assim como, correlação negativa com a concentração plasmática de adiponectina (Carter *et al.*, 2009a; Burns *et al.*, 2010).

O TNF $\alpha$  é responsável pela supressão da transcrição de adiponectina, citocina relacionada com sensibilidade à insulina, sugerindo seu envolvimento no desenvolvimento da diabetes gestacional em humanos. As elevadas concentrações de TNF $\alpha$  atuam na diminuição da sensibilidade à insulina por indução de falha pós-receptor (GLUT4), uma vez que a insulina se torna incapaz de mobilizar seus receptores do citoplasma para a membrana celular (Catalano, 2010; Galantino-Homer e Engiles, 2012; Vejrazkova *et al.*, 2014). Foi demonstrado em cavalos, que obesidade e RI também estão associados com elevadas concentrações de TNF $\alpha$  (Vick *et al.*, 2007).

Ou seja, apesar de estar claro que cavalos obesos estão em risco aumentado de desenvolver RI, os mecanismos para isso não estão completamente compreendidos (Firshman e Valberg, 2007).

### Laminite

Um dos fatores que faz da SME uma condição tão devastadora para o cavalo é a associação com o aumento do risco de laminite (Frank *et al.*, 2006). Laminite é uma condição inflamatória degenerativa do casco que muitas vezes leva à eutanásia (Adams, 2012). É uma condição intensamente dolorosa, muitas vezes irreversível e atualmente sem cura ou tratamento efetivo (de Laat *et al.*, 2014).

A patogênese da laminite não é completamente compreendida e estudos na regulação do transporte de glicose nas lâminas são escassos e conflitantes (de Laat *et al.*, 2014). É comumente reconhecida em associação com disfunções da pituitária *pars intermedia* (PPID, Cushing) ou como um potencial risco de tratamentos com glicocorticoide (Johnson *et al.*, 2004).

A laminite associada à pastagem tem importantes implicações econômicas e de bem-estar, representando uma estimativa de 54% dos casos de laminite equina nas quais a causa inicial é identificável. Os episódios agudos de laminite associada à pastagem são documentados na primavera e início do



verão (Carter *et al.*, 2009a). O fructano, assim como o amido, possui efeito hiperinsulinêmico em cavalos e o seu consumo tanto no feno quanto no pasto podem aumentar a insulina sérica (Durham *et al.*, 2008). No entanto, atualmente, a laminite associada à pastagem é considerada uma resposta anormal do animal à altos conteúdos de carboidratos presentes em pastos vistosos, ao invés de uma sobrecarga de carboidrato, mas especificamente fructano, como se acreditava anteriormente (Wylie, 2013).

A hiperinsulinemia associada com RI é um fator de risco pro desenvolvimento de laminite e diretamente envolvido na patogênese (George *et al.*, 2009; Burns *et al.*, 2010; de Laat *et al.*, 2014). Estudos induziram laminite em cavalos e pôneis normais pela manutenção de altas concentrações de insulina por períodos prolongados (Bamford *et al.*, 2014). Treiber *et al.*, 2006 mostraram que um grande grupo de pôneis com RI, dislipidemia e obesos eram 10 vezes mais propensos a desenvolver laminite clínica.

Um CC de 7 vem sendo reportado como o valor limite em que pôneis estão predispostos à risco aumentado de desenvolver laminite associada à pastagem (Dugdale *et al.*, 2012). Foi hipotetizado também que as concentrações de triglicérides, RISQI (raiz quadrada da concentração da insulina) e MIRG (razão modificada da glicose e insulina) poderiam ser usadas para predizer laminite incipiente. O risco aumentado de laminite associada à pastagem em pôneis aparentemente normais foi caracterizado como uma série de fatores conhecida como Síndrome Metabólica Prélaminítica. Esses fatores incluem RISQI  $<0,32$  [ $\mu\text{U/l}$ ]-0,5, MIRG aumentado, hipertrigliceridemia ( $>570$  mg/l) e obesidade (CC  $> 6$ , 1 a 9), com depósitos de gordura localizados no pescoço e cabeça da cauda (Carter *et al.*, 2009a).

A identificação dos indivíduos com resposta insulinêmica pós prandial exacerbada pode permitir um manejo melhor de animais com risco de desenvolver laminite associada à pastagem (Bamford *et al.*, 2014). A incapacidade em se diagnosticar a laminite hiperinsulinêmica antes do desenvolvimento dos sinais clínicos tem impedido o progresso das pesquisas (Wylie, 2013).

## Diagnóstico

O diagnóstico da SME é baseado no conhecimento da predisposição racial e/ou familiar, idade, características fenotípicas, história clínica e testes laboratoriais (Divers, 2010). Enquanto características físicas como alto CC (maior que 7), adiposidade regional, presença de crista no pescoço auxiliam no diagnóstico, testes laboratoriais são críticos para confirmar ou até indicar a severidade da SME (Adams, 2012).

Variáveis mensuradas individualmente como glicose, insulina, ácidos gordos livres ou triglicérides oferecem meios mais convenientes, mesmo que aproximados, de se identificar a RI (Durham *et al.*, 2008).

Para acessar a RI em cavalos e humanos são utilizados métodos diretos e indiretos de complexidade variada. Entre os métodos diretos estão o *clamp* euglicêmico e o teste de supressão da insulina e os indiretos incluem o teste clássico de tolerância à glicose ou testes adaptados como o método do modelo matemático mínimo (Bertin e Sojka-Kritchewsky, 2013).

O teste laboratorial de suporte mais simples para a detecção da SME é a medida da insulina plasmática após jejum noturno. O sangue é coletado pela manhã (8-10 horas) após aproximadamente 6 horas de jejum de concentrado e fornecimento de mínimas quantidades de feno. Os valores normais para cavalos são menores que  $20 \mu\text{U/ml}$ . Para pôneis e *mini horses* os valores de referência são similares mas podem ser maiores (Divers, 2010; Adams, 2012).

A concentração plasmática de glicose em jejum é normalmente entre 60 e 90 mg/dL em cavalos (Ralston, 2002). A hiperglicemia no jejum não é um índice confiável de RI porque as concentrações plasmáticas de glicose são mantidas em uma faixa limite por uma forte homeostase de glicose envolvendo muitos reguladores, incluindo insulina (Treiber *et al.*, 2005). Ela pode indicar tanto uma resposta reduzida das células  $\beta$  do pâncreas à glicose quanto uma habilidade reduzida na captação de glicose pelos tecidos periféricos, o que pode ou não ser devido à resistência dos tecidos aos efeitos da insulina (Firshman e Valberg, 2007).

Sendo assim, uma única amostra sanguínea em jejum para determinar as concentrações de insulina e glicose pode ser considerada uma avaliação específica da sensibilidade à insulina. Essas análises podem ser usadas a campo para identificar cavalos resistentes à insulina, no entanto, a precisão vem sendo questionada porque ambas as concentrações podem variar muito individualmente em um período curto devido à variação diária, alimentação e stress, além de que em estágios mais avançados da RI em cavalos, a compensação pancreática se torna inadequada e a hiperinsulinemia pode não ser detectada (Firshman e Valberg, 2007).

A outra metodologia possível é o modelo mínimo, que é uma construção matemática, que fornece com maiores detalhes o acesso à glicose e à dinâmica da insulina (Bergman, 1989). Trata-se de um modelo fisiológico que usa análise matemática não linear baseado nos dados de glicose e insulina obtidos em um teste dinâmico de tolerância à glicose. Ele fornece medidas de quatro parâmetros: sensibilidade à insulina (Si), eficácia da glicose (Sg), resposta aguda à glicose (AIRg) e índice de disposição (DI; Kronfeld, 2006).

O *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico tem sido considerado como o "padrão ouro" para o diagnóstico de RI tecidual em equinos (Geor *et al.*, 2010; Frank e Tadros, 2014). Após receber uma dose inicial de insulina, o animal recebe uma infusão contínua de insulina (3-6 mU/kg/min) e a glicemia é mantida a um valor constante (cerca de 5 mmol/L) ajustando a taxa de infusão de glicose. No estado estacionário, a taxa de infusão de glicose (corrigida para considerar a glicose que não tenha sido adicionada ou removida

pelo metabolismo) fornece a taxa de retirada de glicose induzida pela insulina. Uma baixa taxa de infusão de glicose indica RI tecidual, enquanto uma alta taxa de infusão indica descarte efetivo de glicose induzido por insulina e sensibilidade à insulina. Em uma população geral de equinos, um valor menor que 7  $\mu\text{mol/kg/min}$  indicaria RI tecidual (Kronfeld *et al.*, 2005; Pratt *et al.*, 2005; Bertin e de Laat, 2017). No entanto, assim como o *clamp*, o modelo mínimo é tecnicamente trabalhoso e caro, e então inapropriado em situações que necessitem de múltiplas observações como estudo de populações ou monitoramento diário de casos (Kronfeld *et al.*, 2005).

Pensando nisso, Treiber *et al.* (2005) adaptaram *proxies* de monitoramento da sensibilidade à insulina e responsividade das células  $\beta$  pancreáticas usados efetivamente em humanos e dois novos desenvolvidos para equinos (RISQI e MIRG). Os *proxies* permitem identificar propriedades da resistência e regulação da insulina com poder estatístico sendo então superiores à índices não específicos como hiperinsulinemia basal (jejum) ou intolerância à glicose (Treiber *et al.*, 2005).

A determinação dos dois *proxies* deve ser feita a partir da coleta de amostra sanguínea do animal em jejum seguida da mensuração laboratorial das concentrações plasmáticas de glicose (mg/dl) e insulina (mUI/l) e os cálculos respectivos, sendo eles: a raiz quadrada da concentração da insulina (RISQI =  $1/\sqrt{\text{concentração insulina basal}}$ ) e a razão modificada da glicose e insulina (MIRG =  $[800 - 0,3 \times (\text{concentração insulina basal} - 50)^2] / (\text{concentração glicose basal} - 30)$ ), obtendo-se assim a sensibilidade insulínica e a resposta das células  $\beta$ -pancreáticas, respectivamente (Treiber *et al.*, 2006).

Se o aumento nas concentrações de insulina não é o resultado observado em um cavalo com características físicas condizentes com SME, um teste dinâmico deve ser realizado (Adams, 2012). Um teste intravenoso de tolerância é usado para aumentar os níveis de glicose e insulina sanguíneos e determinar quanto tempo demora para essas mensurações retornarem aos níveis basais. Esse teste também pode ser realizado por via oral, sendo menos trabalhoso para o operador e o animal (Firshman e Valberg, 2007; Adams, 2012). A resposta plasmática de glicose e insulina a um desafio de glicose por via oral é conhecido como teste de tolerância à glicose (Roberts e Hill, 1973).

O teste oral de tolerância à glicose avalia a absorção de glicose pelo intestino delgado, a captação hepática de glicose e a função endócrina do pâncreas. O teste exige jejum durante a noite. A glicose pode ser mensurada nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração de 1g/kg de peso vivo de glicose, via sonda nasogástrica (pode causar estresse e alterar níveis de glicose) ou oral. Os tempos pós administração podem variar de acordo com a curva desejada pelo examinador. Os níveis atingem um pico entre 90 a 120 min após a administração de glicose e retornam aos níveis basais após 4 a 6 horas. Uma resposta da glicose maior do

que o normal sugere função pancreática reduzida ou RI (Firshman e Valberg, 2007).

## Terapêutica e Prevenção

A prevenção da SME inclui monitoramento do peso e das medidas da circunferência do pescoço, controle do peso pelo controle da ingestão de carboidratos não estruturais, além de exercícios adequados (Divers, 2010).

Foi reportado em cavalos comendo dietas com alto teor de carboidratos, menor sensibilidade à insulina comparada com cavalos se alimentando de dietas com altas concentrações de gordura e fibra (Bertin e Sojka-Kritchevsky, 2013). Gorduras ou óleos tem mais do que duas vezes a densidade de energia de grãos, e sua inclusão na ração promove eficiência de utilização. Os mais palatáveis são óleo de milho e farelo de arroz (Kronfeld *et al.*, 2005). Um maior conteúdo de gordura na dieta pode atrasar ou diminuir a resposta do pico glicêmico por atrasar o esvaziamento gástrico em humanos, mas não é conhecido se isso ocorre em cavalos (Firshman e Valberg, 2007).

A levotiroxina pode ser prescrita para equinos com aumento da adiposidade para acelerar a perda de peso por conta do aumento da taxa metabólica, mas as mudanças na dieta e nos exercícios devem, idealmente, ser implementadas ao mesmo tempo. A administração de levotiroxina a equinos hípidos de 500 kg em doses entre 24 e 96 mg via oral por até 48 semanas foi bem tolerada e aumentou a sensibilidade à insulina (Frank *et al.*, 2005). O cloridrato de metformina é comumente prescrito para o manejo de desregulação insulínica em equinos. As dosagens variam de 15-30 mg/kg, com intervalos de 8 a 12 horas, por vira oral e a droga deve idealmente ser administrada 30-60 minutos antes da alimentação (Duhram *et al.*, 2019). O tratamento medicamentoso do SME nunca deve ser usado como substituto para intervenções de dieta e exercício (Duhram *et al.*, 2019).

## Conclusões

A SME é um problema atual, e tem despertado muito interesse nos últimos anos, principalmente devido as suas graves consequências na saúde e no bem-estar dos animais. Os avanços nas pesquisas trouxeram um vasto conhecimento sobre vários aspectos, no entanto, algumas dúvidas ainda persistem como por exemplo, a influência da SME na gestação, como realizar o diagnóstico e a prevenção e quais as possíveis consequências para poldros a curto e longo prazo. Mais pesquisas devem ser realizadas para que se elucide esses e outros pontos e para que possamos nos questionar se estamos alimentando adequadamente nossas reprodutoras e quais os impactos na saúde e performance dos poldros.

**Agradecimentos:** À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Nº 2017/05425-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Referências

- Adams A (2012), Equine Metabolic Syndrome: Challenges and Advances, 18th Kentucky Equine Research Conference, 118–126.
- Akbari H et al. (2015), Experimental hyperlipidemia induces insulin resistance in sheep, *Domestic Animal Endocrinology*, 53, 95-102.
- Aoki T e Ishii M (2012), Hematological and Biochemical Profiles in Peripartum Mares and Neonatal Foals (Heavy Draft Horse), *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(3), 170–176.
- Arfuso F et al. (2016), Serum levels of mitochondrial uncoupling protein 1, leptin, and lipids during late pregnancy and the early postpartum period in mares, *Theriogenology*, 86(5), 1156–1164.
- Argo CM, Curtis, GC, Grove-White, D, Dugdale AHA, Barfoot, CF, Harris, PA (2012), Weight loss resistance: A further consideration for the nutritional management of obese Equidae, *Veterinary Journal*, 194(2), 179–188.
- Auyyuenyong R et al. (2018), Determination of lipid profiles in serum of obese ponies before and after weight reduction by using multi-one-dimensional thin-layer chromatography, *Research in Veterinary Science*, 117, 111–117.
- Bamford NJ et al. (2014), Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score, *Domestic Animal Endocrinology*, 47(1), 101–107.
- Berg EL, McNamara DL, Keisler DH (2007), Endocrine profiles of periparturient mares and their foals. *Journal of andrology*, 85, 1660–1668.
- Bergman RN (1989), Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal model, *Diabetes*, 38, 1512–1527.
- Bertin FR e de Laat MA (2017), The diagnosis of equine insulin dysregulation, *Equine Veterinary Journal*, 49, 570-576.
- Bertin FR e Sojka-Kritchevsky JE (2013), Comparison of a 2-step insulin-response test to conventional insulin-sensitivity testing in horses, *Domestic Animal Endocrinology*, 44(1), 19–25.
- Brown-Douglas CG, Huntington PJ, Pagan JD (2011), Growth of horses, in *Equine Reproduction*. 2nd edn. Blackwell Publishing Ltd, 280–291.
- Burns TA et al. (2010), Proinflammatory cytokine and chemokine gene expression profiles in subcutaneous and visceral adipose tissue depots of insulin - resistant and insulin - sensitive light breed horses, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 932–939.
- Butte N (2000), Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus, *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1256–1261.
- Carter RA et al (2009), Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies, *The Veterinary Journal*, 179(2), 204–210a.
- Carter RA et al. (2009), Prediction of incipient pasture-associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies, *Equine veterinary journal*, 41(2), 171–8b.
- Cartmill J et al. (2003), Endocrine responses in mares and geldings with high body condition scores grouped by high vs. low resting leptin concentrations, *American Society of Animal Science*, 81, 2311–2321.
- Catalano PM (2010), Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome, *Reproduction*, 140(3), 365–371.
- Chaldakov GN et al. (2003), Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology, *Current pharmaceutical design*, 9(12), 1023–1031.
- Chiu JD et al. (2009), Experimental hyperlipidemia dramatically reduces access of insulin to canine skeletal muscle, *Obesity (Silver Spring, Md.)*. Nature Publishing Group, 17(8), 1486–1492.
- Coverdale JA, Hammer CJ, Walter KW (2015), HORSE SPECIES SYMPOSIUM: Nutritional programming and the impact on mare and foal performance, 3261–3267.
- Crandell KG et al. (1999), A comparison of grain, oil and pulp as energy sources for the exercised horse, *Equine Exercise Physiology*, 30, 485–489.
- Divers TJ (2010), Update on metabolic diseases associated with laminitis in horses and ponies, *Journal of Equine Veterinary Science*, 30(9), 504–505.
- Dugdale AHA et al. (2011), Effects of season and body condition on appetite, body mass and body composition in ad libitum fed pony mares, *Veterinary Journal*, 190(3), 329–337.
- Dugdale AHA et al. (2012), Body condition scoring as a predictor of body fat in horses and ponies, *Veterinary Journal*, 194(2), 173–178.
- Durham AE, Rendle DI, Newton JE (2008), The effect of metformin on measurements of insulin sensitivity and beta cell response in 18 horses and ponies with insulin resistance, *Equine Veterinary Journal*, 40(5), 493–500.
- Durham AE et al. (2019), ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33, 335–349.
- El-Dorf AAE, Ossman AME, El-Halwagy AES, Borg HM, Abd-Elbar ES (2016), Use of serum leptin and insulin hormones levels as predictors of pregnancy outcome in pregnant women with history of recurrent early pregnancy loss, *Middle East Fertility Society Journal*, 21(1), 36–40.
- Elzinga SE, Wood PL e Adams AA (2015), Characterization of lipid and inflammatory profiles in horses with equine metabolic syndrome, *J Equine Vet Sci*, 35(5), 426.
- Ertelt A et al. (2014), Metabolic syndrome: is equine disease comparable to what we know in humans?, *Endocrine Connections*, 3, 1–13.
- Fernandes CB. et al. (2014), Which paternal, maternal and placental parameters influence foal size and

- vitality?, *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), 225–227.
- Firshman AM e Valberg SJ (2007), Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in horses, *Equine Veterinary Journal*, 39(6), 567–575.
- Fowden AL, Comline RSE, Silver M (1984), Insulin secretion and carbohydrate metabolism during pregnancy in the mare, *Equine Veterinary Journal*, 16(4), 239–46.
- Fradinho MJ, Correia MJ, Grácio V, Bliedernicht M, Farrim A, Mateus L, Martin-Rosset, W, Bessa RJB, Caldeira RM, Ferreira-Dias G (2014), Effects of body condition and leptin on the reproductive performance of Lusitano mares on extensive systems, *Theriogenology*, 81(9), 1214–1222.
- Frank N (2011), Equine metabolic syndrome, *Vet Clin Equine*, 27(1), 73–92.
- Frank N, Elliott SB, Brandt LE, Keisler DH (2006), Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(9), 1383–1390.
- Frank N, Sommardahl CS, Eiler H, Webb LL, Denhart JW, Boston RC (2005), Effects of oral administration of levothyroxine sodium on concentrations of plasma lipids, concentration and composition of very-low-density lipoproteins, and glucose dynamics in healthy adult mares, *Am J Vet Res*, 66(6), 1032–1038.
- Frank N, Sojka, JE, Latour MA (2002), Effect of withholding feed on concentration and composition of plasma very low density lipoprotein and serum nonesterified fatty acids in horses, *Am J Vet Res*, 63, 1018–1021.
- Frank N, Tadros, EM (2014), Insulin dysregulation, *Equine Vet. J.*, 46, 103–112.
- Galantino-Homer HL e Engiles JB (2012), Insulin resistance and laminitis in broodmares, *J Equine Vet Sci*, 32(10), 680–688.
- Geor RJ, Stewart-Hunt L, McCutcheon LJ (2010), Effects of prior exercise on insulin-mediated and noninsulin-mediated glucose uptake in horses during a hyperglycaemic clamp. *Equine Vet J*, 42, Suppl. 38, 129–134.
- Geor RJ e Frank N (2009), Metabolic syndrome-From human organ disease to laminar failure in equids, *Veterinary immunology and immunopathology*, 129(3–4), 151–154.
- George LA et al. (2009), Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition, *Domestic Animal Endocrinology*, 37(1), 23–29.
- George LA et al. (2011), Evaluation of the effects of pregnancy on insulin sensitivity, insulin secretion, and glucose dynamics in Thoroughbred mares, *American Journal of Veterinary Research*, 72(5), 666–674.
- De Graaf-Roelfsema E (2014), Glucose homeostasis and the enteroinsular axis in the horse: A possible role in equine metabolic syndrome, *Veterinary Journal*, 199(1), 11–18.
- Hammer CJ et al. (2011), Effect of Dietary Energy Manipulation on Mares and their Foals: Colostrum and IgG, *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(5–6), 308–309.
- Harvey JW, Pate MG, Kivipelto J, Asquith RL (2005), Clinical biochemistry of pregnant and nursing mares. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(3), 248–254.
- Heidler B, Parvizi N, Sauerwein H, Bruckmaier RM et al. (2003), Effects of lactation on metabolic and reproductive hormones in Lipizzaner mares, *Domestic Animal Endocrinology*, 25, 47–59.
- Henneke DR et al. (1983), Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares, *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 371–376.
- Henson MC, Castracane VD (2006), Leptin in pregnancy: an update, *Biology of Reproduction*, 74, 218–229.
- Hoffman RM et al. (2003), Glucose clearance in grazing mares is affected by diet, pregnancy, and lactation, *Journal of Animal Science*, 81(7), 1764–1771.
- Huff NK, Thompson DL, Gentry LR, Depew CG (2008), Hyperleptinemia in mares: prevalence in lactating mares and effect on rebreeding success, *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(10), 579–586.
- Johnson PJ (2002), The equine metabolic syndrome 'Peripheral Cushing' s syndrome, *The Veterinary Clinics Equine Practice*, 18, 271–293.
- Johnson PJ, Messer NT, Ganjam VK (2004), Cushing's syndromes, insulin resistance and endocrinopathic laminitis, *Equine veterinary journal*, 36(3), 194–198.
- Kedzierski W, Kapica M, Kolstrung R, Pluta M (2008), Concentrations of plasma leptin, ghrelin and parameters of lipid metabolism in purebred Arabian and pony mares during the periparturient period, *Med Weter*, 64, 427–430.
- Kedzierski W, Kowalik S (2009), Leptin and ghrelin and the indices of lipid metabolism as related to sex steroid hormones in trotters, *J Equine Vet Sci*, 29, 17–23.
- Kedzierski W, Kusy R e Kowalik S (2011), Plasma Leptin Level in Hyperlipidemic Mares and Their Newborn Foals, *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 275–280.
- Kronfeld DS et al. (2005), Insulin resistance in the horse : Definition, detection, and dietetics, *Journal of Animal Science*, 83, E22–E31.
- Kronfeld DS (2006), Insulin resistance predicted by specific proxies, *Equine Nutrition*, 26(6), 281–284.
- de Laat MA (2013), Reining in equine metabolic syndrome: A gluttony of challenges, *Veterinary Journal*, 196(2), 141–142.
- de Laat MA (2014), Toll-like receptor and pro-inflammatory cytokine expression during prolonged hyperinsulinaemia in horses: Implications for laminitis, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 157(1–2), 78–86.
- Laborde JB, Wall KS, Bolon B et al. (1999), Haematology and serum chemistry parameters of the pregnant rat, *Lab Anim*, 33, 275–287.

- McCue ME, Geor RJ, Schultz N (2015), Equine metabolic syndrome: a complex disease influenced by genetics and the environment, *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(5), 367–375.
- Morresey PR (2013), Metabolic diseases - do we really know if they affect reproduction?, in *Proceedings of the Society for Theriogenology 2013 Annual Conference. Clinical Theriogenology*.
- Nishii N *et al.* (2012), Experimental Hyperlipemia Induces Insulin Resistance in Cats, *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2), 267–269.
- Peluso I e Palmery M (2015), The relationship between body weight and inflammation: Lesson from anti-TNF- a antibody therapy', *Human Immunology. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*, 77(1), 1-7.
- Peugnet P *et al.* (2016), Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring, *Theriogenology*, 86(1), 99–109.
- Pires JAA, Souza AH, Grummer RR (2007), Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows, *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2735–44.
- Powell DM *et al.* (2002), Effect of short-term exercise training on insulin sensitivity in obese and lean mares, *Equine Veterinary Journal*, 34(S34), 81–84.
- Pratt SE, Geor RJ, McCutcheon LJ (2005), Repeatability of 2 methods for assessment of insulin sensitivity and glucose dynamics in horses. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 883-888.
- Ralston SL (2002), Insulin and glucose regulation, *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 18(2), 295–304, vii.
- Roberts MC, Hill FW (1973), The Oral Glucose Tolerance Test in the Horse, 5(4), 171–173.
- Romagnoli U, Macchi E, Romano G, Motta M, Accornero P, Baratta M (2007), Leptin concentration in plasma and in milk during the interpartum period in the mare, *Animal Reproduction Science*, 97(1–2), 180–185.
- Satterfield MC, Coverdale JA, Wu G (2010), Review of Fetal Programming : Horse Health Implications to, *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 56, 207–214.
- Sillence MN (2012), "Supersize me": On equine obesity, *Veterinary Journal*, 194(2), 137–138.
- Sillence MN, Noble G, McGowan C (2006), Fast food and fat fillies: The ills of western civilisation, *Veterinary Journal*, 172(3), 396–397.
- Simmons M, Battaglia F, Meschia G (1979), Placental transfer of glucose, *Journal of Developmental Physiology*, 1, 7–243.
- Smith S, Marr CM, Dunnett C, Menzies-Gow NJ (2017), The effect of mare obesity and endocrine function on foal birthweight in Thoroughbreds, *Equine Veterinary Journal*, 49(4), 461–466.
- Tadros EM *et al.* (2013), Effects of intravenous lipopolysaccharide infusion on glucose and insulin dynamics in horses with equine metabolic syndrome, *American Journal of Veterinary Research*, 74(7), 1020–1029.
- Treiber KH *et al.* (2005), Use of proxies and reference quintiles obtained from minimal model analysis for determination of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell responsiveness in horses, *American Journal of Veterinary Research*, 66(12), 2114–2121.
- Treiber KH, Kronfeld DS, Geor RJ (2006), Insulin resistance in Equids: Possible Role in Laminitis, *American Society for Nutrition*, (11), 2094–2098.
- Vejrazkova D *et al.* (2014), Steroids and insulin resistance in pregnancy, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 122–129.
- Vick MM *et al.* (2007), Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse, *Journal of Animal Science*, 85(5), 1144–55.
- Waldhaus W (1989), Circadian rhythms of insulin needs and actions, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 6, 17–24.
- Watson TDG *et al.* (1993), Effects of pregnancy and lactation on plasma lipid and lipoprotein concentrations, lipoprotein composition and post-heparin lipase activities in Shetland pony mares, *Journal of Reproduction and Fertility*, 97, 563–568.
- Wylie CR (2013), Equine laminitis: What is all the hype about hyperinsulinaemic laminitis?, *Veterinary Journal*, 196(2), 139–140.
- Yilmaz O, Kucuk M, Ilgin A, Dagdelen M (2010), Assessment of insulin sensitivity/resistance and their relations with leptin concentrations and anthropometric measures in a pregnant population with and without gestational diabetes mellitus, *Journal of Diabetes and its Complications*, 24(2), 109–114.

## Técnicas para avaliação da eficiência da cultura *in vitro* de folículos ovarianos de ruminantes

### Techniques for evaluating *in vitro* culture efficiency of ruminant ovarian follicles

Renato F. Silva<sup>1</sup>, Laritza F. Lima<sup>1</sup>, Gerlane M. Silva<sup>1</sup>, José R.S. Passos<sup>1</sup>, José R. Figueiredo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-antrais, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

**Resumo:** A avaliação da proliferação das células da granulosa e da sobrevivência de folículos pré-antrais (FPs) antes e após o cultivo *in vitro* pode garantir o monitoramento de possíveis alterações que afetam a eficiência dessa técnica. Desta forma, é de grande relevância o conhecimento das técnicas disponíveis para a melhoria dos sistemas de crescimento *in vitro* de FPs. As diferentes técnicas invasivas e não invasivas utilizadas para avaliar a qualidade folicular serão descritas na presente revisão. Como técnicas invasivas serão abordadas a histologia com uso da imunohistoquímica; Diclorofluoresceína, Mito Tracker, qRT-PCR, Microarranjo, Western blot, Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e Análise proteômica. Como técnicas não invasivas serão descritos: o uso de Corantes vitais (Vermelho neutro e azul de crezil) para avaliação sob microscopia; e a avaliação da secreção de substâncias foliculares durante o cultivo *in vitro* por meio da metabolômica e secretômica.

Palavras-chave: folículos, cultivo *in vitro*, técnicas invasivas e não invasivas.

**Summary:** The evaluation of granulosa cell proliferation and the survival of preantral follicles (PFs) before and after *in vitro* culture can ensure the monitoring of possible changes that affect the efficiency of this biotechnology. Therefore, it is of great relevance the knowledge of the techniques available for the improvement of the *in vitro* growth systems of FPs. The different invasive and noninvasive techniques used to evaluate follicular quality will be described in the present review. As invasive techniques will be approached the histology with the use of immunohistochemistry; Dichlorofluorescein, Mito Tracker, qRT-PCR, Microarray, Western blot, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Proteomic Analysis. As non-invasive techniques will be described: the use of vital dyes (neutral red and crezil blue) for evaluation under microscopy; and the evaluation of the secretion of follicular substances during *in vitro* culture through metabolomics and secretomy.

Keywords: follicles, *in vitro* culture, invasive and non-invasive

### Introdução

As técnicas de reprodução das fêmeas visam principalmente o estudo dos mecanismos reprodutivos, aumento do potencial reprodutivo de animais, bem como a multiplicação mais eficiente dos genótipos utilizados (Figueiredo et al., 2007). Embora, algumas dessas técnicas existam há mais de 50 anos, nos últimos dez anos houve uma grande melhoria das já existentes e o desenvolvimento de novas. Dentre elas, podemos destacar a técnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA), também conhecida como ovário artificial, que vem sendo desenvolvida com o objetivo de recuperar um grande número de oócitos inclusos nesses folículos e, posteriormente, cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação evitando o processo de atresia. Deste modo, o uso de tecnologias *in vitro*, como o ovário artificial através do cultivo *in vitro*, apresenta-se como uma ferramenta para amenizar o processo de perda natural por atresia da grande maioria dos folículos presentes no ovário (Lima et al., 2013; Lima et al., 2016).

Até o presente momento, o resultado mais promissor oriundo dessa técnica foi o nascimento de crias vivas na espécie murina (O'Brien et al., 2003) a partir de folículos primordiais cultivados *in vitro*. Ao contrário, em ruminantes domésticos (caprino: Magalhães et al., 2011; ovino: Arunakumari et al., 2010; bubalino: Gupta et al., 2008) apenas um número restrito e extremamente variável de embriões tem sido produzidos a partir de folículos secundários cultivados *in vitro*. Embora esses resultados sejam promissores, ainda não são suficientes para tornar esta técnica aplicável comercialmente. Portanto, a melhoria de sistemas de cultivo *in vitro* que possam permitir o crescimento dos folículos ovarianos, resultando em oócitos maduros, aptos a serem fecundados *in vitro* é muito importante para a compreensão da foliculogênese e para a preservação de células germinativas femininas (Mao et al., 2002).

Nesse contexto, o conhecimento das técnicas que permitem avaliar/monitorar a qualidade folicular antes

\*Correspondência: jrf.lamofopapapers@gmail.com.  
Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

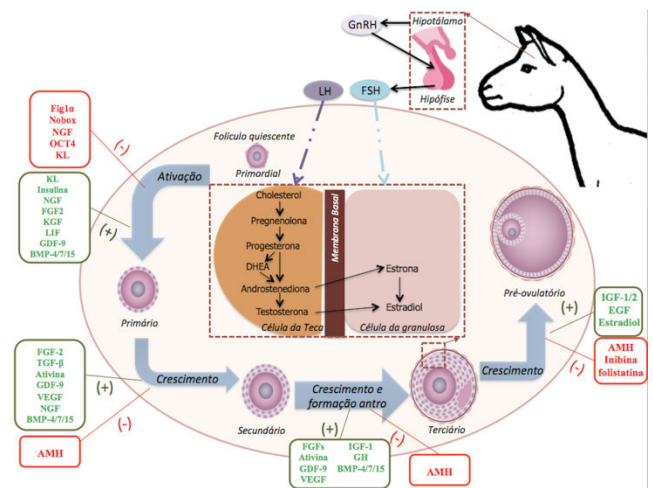
e após o cultivo é fundamental para a melhoria da eficiência dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (FPs). As técnicas disponíveis podem ser classificadas em invasivas e não invasivas. As primeiras impedem a posterior utilização dos FPs, enquanto as segundas, mantêm as estruturas vivas permitindo a sua posterior utilização após as análises. Assim, o objetivo deste trabalho é a descrição de algumas técnicas que podem ser utilizadas para avaliar a eficácia da cultura *in vitro* de folículos ováricos. Desta forma, a presente revisão abordará de forma sucinta a foliculogênese e o cultivo *in vitro* e com mais detalhes as formas de avaliação do desenvolvimento folicular com ênfase nas principais técnicas invasivas e não invasivas utilizadas para a avaliação da qualidade folicular durante o cultivo *in vitro*.

### Foliculogênese e caracterização folicular

O ovário é um órgão do sistema reprodutor das fêmeas, responsável pela liberação de oócitos maduros, ou aptos a fertilização (Mcgee e Hsueh, 2000), bem como pela síntese e secreção de fatores de crescimento e hormônios (Liu et al., 2001). O folículo é considerado a unidade morfofuncional dos ovários, sendo composto por um oócito rodeado por células somáticas (células da granulosa – em todas as categorias; e da teca – a partir de folículos secundário), as quais proporcionam um ambiente ideal para a sobrevivência, o crescimento e a maturação do oócito (Glister et al., 2005; Barnett et al., 2006). De acordo com o desenvolvimento folicular, ou seja a foliculogênese, os folículos podem ser classificados em FPs, que abrangem os folículos primordiais, transição (quando as células da pré-granulosa pavimentosa circundantes tornam-se cubóides e começam a proliferar - Silva et al., 2004), primários e secundários, e folículos antrais, correspondendo os folículos terciários e de De Graaf ou pré-ovulatórios (Silva et al., 2004). Os folículos primordiais representam cerca de 95% da totalidade dos FPs presentes no ovário (Erickson, 1986). No entanto, durante a vida reprodutiva das fêmeas, apesar de muitos folículos serem ativados, apenas uma pequena parte (0,01%) é capaz de se desenvolver até a ovulação, sendo que a grande maioria (99,9%) é perdida por um processo natural conhecido como atresia.

A foliculogênese é um processo complexo e dinâmico que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o folículo pré-ovulatório. Durante este processo ocorre uma sequência de desenvolvimento altamente regulada pela interação de vários fatores intra e extra-ovarianos (Figura 1). A capacidade do oócito para alcançar a completa maturação e assegurar o desenvolvimento embrionário é gradualmente adquirida durante o desenvolvimento folicular (revisto por Figueiredo et al., 2018). O sucesso desse processo que resulta na produção de oócito de boa qualidade depende de uma boa interação entre o oócito e suas células foliculares

somáticas circundantes (células da granulosa e da teca), bem como da interação entre estas células, associado ao balanço adequado de vários fatores intra e extra-ovarianos (para mais detalhes desse mecanismo ver revisões: Reddy et al., 2008; Hsueh et al., 2014; Atwood et al., 2016; Figueiredo et al., 2018).



**Figura 1** – Representação da complexa interação entre os fatores estimulatórios (em verde) e inibitórios (em vermelho) que atuam em diferentes etapas do desenvolvimento folicular. Figura inspirada em: Atwood e Meethal, (2016).

### Cultivo *in vitro*

Como mencionado anteriormente, o ovário é composto por uma grande população de FPs, no entanto, a grande maioria degenera por atresia e apenas uma pequena percentagem alcança a ovulação, o que torna o rendimento ovariano (número de ovulações durante a vida em relação ao total de folículos presentes) muito baixo. Desta forma, várias técnicas reprodutivas têm sido amplamente utilizadas nos últimos anos na tentativa de melhorar a eficiência reprodutiva em animais, como por exemplo a técnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA). Por meio do cultivo *in vitro*, no futuro, a MOIFOPA poderá contribuir para a padronização de técnicas, como a clonagem, FIV e transgênese, uma vez que poderiam ser utilizados oócitos um mesmo estágio de desenvolvimento e de mesma origem (Telfer e McLaughlin, 2011).

Diversos fatores podem influenciar no desenvolvimento folicular durante o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais a estágios mais avançados (Peng et al., 2010), entre eles podemos destacar, o tipo de sistema de cultivo, a composição do meio, e a adição de substâncias ao meio. De acordo com o sistema de cultivo, os folículos podem ser cultivados “*in situ*”, ou seja, inclusos em fragmentos do córtex ovariano ou na forma isolada. O cultivo de folículos inclusos no córtex do tecido (*in situ*) ovariano tem a vantagem de manter o contato celular (Abir et al., 2006) e a integridade tridimensional dos folículos. Além disso, permite averiguar o efeito das diferentes substâncias sobre a ativação e crescimento

folicular, até o estágio de folículo secundário (Matos et al., 2007). Por outro lado, a utilização do sistema in situ não permite o desenvolvimento dos folículos até o estágio antral, sendo necessária a realização de um cultivo em duas etapas, ou seja, após o cultivo in situ, os folículos devem ser isolados e cultivados individualmente até a fase antral. O cultivo de folículos isolados permite, além do acompanhamento individual dos folículos durante o cultivo, uma maior perfusão do meio para o folículo (Figueiredo et al., 2007).

Já em relação ao meio de cultivo, diversos meios de base têm sido utilizados para promover o desenvolvimento de FPs, entre eles destacam-se o Meio Essencial Mínimo (MEM) (Silva et al., 2004; Matos et al., 2007) e sua versão modificada  $\alpha$ -MEM. Esses meios geralmente possuem componentes importantes para garantir a viabilidade e crescimento dessas células como: eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos e vitaminas (Picton et al., 2008). Além desses componentes, esses meios são ainda comumente suplementados com diferentes substâncias, as quais são capazes de aumentar o percentual de folículos morfológicamente normais e estimular o crescimento folicular (Silva et al., 2004; Demeestere et al., 2005), como por exemplo piruvato, glutamina, hipoxantina e ITS (Insulina, Transferrina e Selênio), bem como diferentes hormônios, como as gonadotrofinas e os esteroides, e fatores de crescimento, como fator de crescimento e diferenciação GDF-9 (Martins et al., 2008) e o fator de crescimento derivado de plaquetas PDGF (Silva et al., 2017).

#### **Avaliação da eficiência do cultivo in vitro de FPs**

Sabe-se que embriões de boa qualidade (aqueles com habilidade para implantar e desenvolver adequadamente), originam-se de oócitos de boa qualidade, que, por sua vez, são provenientes de folículos que se desenvolveram em um adequado ambiente (Canipari et al., 2000). Desta forma, torna-se necessário a utilização de diferentes técnicas de avaliação folicular para que se possa escolher e desenvolver metodologias de cultivo in vitro de FPs adequadas para o desenvolvimento folicular. Portanto, existem diferentes metodologias destinadas à avaliação da qualidade oocitária e folicular, as quais são combinadas, portanto, uma maior precisão sobre a análise da qualidade folicular (Tabela 1).

#### **Principais técnicas utilizadas na avaliação da eficiência do cultivo in vitro**

##### **Avaliações invasivas: Regiões organizadoras de nucléolo coradas por prata (AgNOR)**

A quantificação das regiões organizadoras de nucléolos através da coloração com prata (AgNOR) tem sido utilizada para avaliar a proliferação celular. Estas regiões são áreas de DNA nucleolares que contêm genes codificadores de RNA ribossomal. A

intensa atividade mitótica obriga a maquinaria celular a sintetizar ribossomos suficientes para as células filha, implicando em maior transcrição destes genes e conseqüentemente, um aumento no número de regiões visualizadas (Derenzini et al., 2000). Realizando um estudo para avaliar as expressões de genes e proteínas das Cx37 e Cx43 de folículos secundários cultivados in vitro recuperados de tecido ovariano ovino vitrificado, Silva et al. (2016) mostraram que as marcações realizadas através de AgNOR e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foram similares para avaliar a presença destas proteínas (Cx37 e Cx43) nos folículos.

#### **Diclorofluoresceína DCF**

É um método baseado na utilização da sonda não fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), a qual atravessa facilmente a membrana celular e sofre desacetilação por ação de enzimas esterases intracelulares, formando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este metabólito não fluorescente, por sua vez, quando em contato com espécies reativas de oxigênio, transforma-se em diclorofluoresceína (DCF), que é altamente fluorescente. Assim, a base deste ensaio é atribuída à emissão de fluorescência que é diretamente proporcional à concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs englobam um grande número de moléculas quimicamente reativas proveniente do oxigênio (Nordberg e Arnér, 2001), as quais podem danificar todos os tipos de biomoléculas, como o DNA, as proteínas e os lipídios. Assim, quanto maior a fluorescência emitida, maior a presença de EROs (Rota, Chignell e Mason, 1999). Em trabalho avaliando a concentração de EROs após cultivo de FPs inclusos em tecido ovariano caprino em diferentes concentrações de PDGF-BB (25 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL), Silva et al. (2017) observaram, após análise por DCF, que não havia diferenças significativas entre os tratamentos com e sem PDGF-BB.

#### **Mito Tracker green FM e Mito Tracker Orange**

Mito Tracker green FM é bastante utilizado para mensurar a atividade das mitocôndrias visto que se torna fluorescente quando encontra o ambiente lipídico da membrana mitocondrial na célula viva, sendo utilizado para localização e mensuração da atividade mitocondrial independente do potencial de membrana. Já o Mito Tracker Orange contém uma porção clorometil moderadamente reativa com tiol para identificação de mitocôndrias. Após incubação, a sonda se difunde passivamente através da membrana plasmática e se acumula nas mitocôndrias ativas, sendo assim dependente do potencial da membrana mitocondrial para poder agir (Agnello et al., 2008). Lins et al. (2017) avaliaram o efeito da adição de rutin sozinho ou em associação com outros antioxidantes no cultivo in vitro de FPs ovinos e não observaram



diferenças significativas entre os tratamentos para atividade mitocondrial.

### **Imunocitoquímica e Imunohistoquímica**

O termo Imunohistoquímica refere-se a um conjunto de metodologias que usam imuno-ensaios para co-localizar um epítipo de interesse em cortes de tecido. Em relação a imunocitoquímica diz respeito a associação de metodologias que usam imuno-ensaios para co-localizar um epítipo de interesse em esfregaços citológicos, preparações citocentrifugadas ou preparações em monocamada (Ferro, 2014). A visualização de uma interação antígeno anticorpo pode ser obtida de diversas formas. Na situação mais comum, um anticorpo é biotinilado, que passará por uma reação com avidina, peroxidase e o diaminobenzidina (DAB) produzindo a coloração. A biotina possui um baixo peso molecular podendo ser conjugado com mais facilidade aos anticorpos. A peroxidase promove uma reação com a biotina, avidina e o DAB adicionado para a produção de diferentes intensidades colorimétricas. Alternativamente, o anticorpo pode também ser marcado com um fluoróforo, como fluoresceína, rodamina ou Flúor Alexa. Em trabalho avaliando a presença das proteínas para as aquoporinas (aqp) 3, 7 e 9 em FPs ovinos isolados, Sales et al. (2015) observaram que as aqp 3 e 9 estavam mais presentes em folículos que formaram antro após o cultivo in vitro.

### **qRT-PCR**

O RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) pode fornecer a mensuração simultânea da expressão gênica em diferentes amostras para um número limitado de genes. Esta técnica torna-se bastante recomendável quando apenas um pequeno número de células está disponível. Através da técnica de qRT-PCR já foi possível identificar a presença de genes para as diferentes substâncias, como hormônios e fatores de crescimento, presentes em folículos ovarianos caprinos e ovinos (Celestino et al., 2010; Celestino et al., 2011; Saraiva et al., 2010; Brito et al., 2014).

### **Microarranjo**

A técnica de microarranjo possibilita a análise da expressão de milhares de genes simultaneamente (Rosa, Rocha e Furlan, 2007). Esta técnica é uma ferramenta valiosa no estudo da foliculogênese, pois permite não só a análise de todo o genoma, ou seja, milhares de genes simultaneamente presentes no folículo, como também estudar as principais vias de sinalização as quais esses genes estão associados. Magalhães-Padilha et al. (2013) utilizando técnicas como microarranjo verificaram que in vivo existem aproximadamente 2.466 genes específicos apenas na transição de FPs para antrais iniciais.

### **Western blot**

Western blot é uma técnica bastante usada na pesquisa para separar e identificar proteínas. Nesta técnica, uma mistura de proteínas é separada com base no peso molecular através de eletroforese em gel. Estes resultados são então transferidos para uma membrana produzindo uma banda para cada proteína. A membrana é então incubada com anticorpos específicos para a proteína de interesse (Mahmood et al., 2012). Em estudo realizado por Guerreiro et al. (2018) foi demonstrado a presença das proteínas ABCB1, ABCC2 e ABCG2 (transportadores de cassetes de ligação a ATP) no oócito de folículos primordiais, transição e primários. Estas proteínas estão relacionadas com o transporte de moléculas como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, peptídeos, lipídios, esteroides, sais biliares e toxinas através de membranas biológicas usando a energia resultante da hidrólise de ATP.

### **Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma excelente técnica de separação de misturas em compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação, principalmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio entre outros compostos. Em trabalho realizado por Gouveia et al. (2015) avaliando o efeito do extrato de *Amburana cearensis* no transporte e sobrevivência de tecido ovariano caprino, observaram que a presença do extrato no meio de transporte preservou a morfologia similar ao controle fresco. A presença dos compostos do extrato vegetal (ácido protocatecúico, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido gálico e kaempferol) que poderiam estar atuando na morfologia do tecido ovariano foi confirmado através de HPLC.

### **Análise proteômica**

A proteômica pode determinar o mapeamento dos produtos proteicos de tecidos, secreções ou tipos celulares tanto em condições naturais como experimentais. Este procedimento pode ser utilizado para a identificação de marcadores moleculares em células de interesse na reprodução como espermatozoides (Moura et al., 2006) bem como, oócitos, podendo contribuir para elucidação de mecanismos envolvidos no desenvolvimento celular tanto in vitro como in vivo.

**Tabela 1** – Principais técnicas utilizadas para avaliar a qualidade folicular após cultivo em ruminantes.

<b>Técnica</b>	<b>Invasiva/ não invasiva</b>	<b>Princípio</b>	<b>Aplicações no cultivo folicular</b>	<b>Referência</b>
AgNOR	Técnica invasiva	AgNOR (marcação de DNA)	Avaliação de proliferação das células da granulosa	Derenzini <i>et al.</i> , (2000)
Diclorofluoresceína DCF	Técnica invasiva	Reage emitindo fluorescência na presença de espécies reativas de oxigênio.	Marcador de estresse oxidativo.	Nordberg e Arnér, (2001)
Mito Tracker green FM e Mito Tracker Orange	Técnica invasiva	Marcadores da atividade mitocondrial.	Avaliação energética celular após cultivo <i>in vitro</i> .	Agnello <i>et al.</i> , (2008)
Imunocitoquímica e Imunohistoquímica	Técnica invasiva	Reação de coloração com proteínas (reação antígeno-anticorpo).	Avaliação de proteínas importantes do desenvolvimento folicular.	Ferro <i>et al.</i> , (2014)
qRT-PCR	Técnica invasiva	Avalia a expressão de RNAm.	Avaliação da expressão de RNAm para genes importantes do desenvolvimento folicular.	Brito <i>et al.</i> , (2014)
Microarranjo	Técnica invasiva	Avalia a expressão de RNAm.	Avaliação da expressão de milhares de genes de forma simultânea para estudo do desenvolvimento folicular.	Rosa <i>et al.</i> , (2007)
Western blot	Técnica invasiva	Avaliação da expressão de proteínas	Avalia a expressão de marcadores do desenvolvimento	Mahmood <i>et al.</i> , (2012)
Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	Técnica invasiva	Separação de misturas em compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis.	Avaliação do fluido folicular em busca de marcadores do desenvolvimento.	Gouveia <i>et al.</i> , (2015)
Análise proteômica	Técnica invasiva	Identificação de proteínas.	Perfil de proteínas expressas nos folículos.	Moura <i>et al.</i> , (2006)
Vermelho neutro e Azul de crezil	Técnica não invasiva	Composto que reage com lisossomos (Vermelho neutro) e com G6PD (Azul de crezil).	Avaliação de danos celulares em ocasião da presença e atividade da enzima.	Fotakis <i>et al.</i> , (2006)
Metabolômica e secretômica	Técnica não invasiva	Método de avaliação do perfil de metabolitos secretados no meio.	Verificação dos metabolitos secretados pelos folículos no meio de cultivo.	Hall, (2006); Lopes <i>et al.</i> , (2015)
Radioimunoensaio, Elisa e Quimioluminescência	Técnica não invasiva	Método de avaliação de produtos celulares secretados.	Avaliação dos produtos secretados pelos folículos como indicadores do desenvolvimento folicular.	Madeira <i>et al.</i> , (2014); Guimarães-Peixoto <i>et al.</i> , (2015); Marchi <i>et al.</i> , (2007)

Estudos realizados por diversas equipes têm demonstrado a descoberta de inúmeras proteínas de grande interesse para a compreensão do funcionamento celular no que se refere a reprodução animal. Um estudo realizado por Fu et al. (2016), avaliando o fluido folicular ovariano de búfalo, identificou a presença de 365 proteínas, das quais estavam relacionadas com 153 vias de sinalização celular. Onze proteínas expressas diferencialmente foram identificadas exercendo diferentes funções como inibição das vias serina-protease, que são um grupo de proteínas importantes na digestão, coagulação do sangue e no sistema imunológico, bem como identificadas proteínas que agem protegendo contra danos da oxidação.

Outro trabalho revelou que em folículos primordiais que iniciaram o processo degenerativo foram encontrados uma maior expressão de genes relacionados a apoptose como BOK e de genes relacionados a reparação do DNA como FIGL1, sugerindo que algumas características comuns do ovário de animais velhos, como a perda da reserva folicular pode ser devida ao degeneração da população folicular, que pode ativar diferentes genes relacionados ao funcionamento da célula (Govindaraj e Rao, 2015).

#### **Avaliação não-invasiva**

A avaliação da eficiência do cultivo de maneira indireta pode ser realizada na célula, com a utilização de corantes vitais, ou através da análise do produto secretado por ela, como hormônios e outros metabólitos. Este sistema é um método não invasivo para a célula, permitindo uma análise mais segura. Assim, a avaliação não-invasiva da eficiência do cultivo pode ser realizada através de diferentes metodologias.

#### **Corantes vitais (Vermelho neutro e Azul de cresil)**

O vermelho neutro atua acumulando-se nos lisossomas de células viáveis. Ele penetra na membrana celular por difusão e se concentra nos lisossomas, onde se fixa através de ligações nos grupos fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal (Fotakis et al., 2006). Em trabalho com folículos pré-antrais bovinos avaliando o efeito do cultivo e da vitrificação sobre a viabilidade folicular, Langbeen et al. (2014) observaram que não houve diferenças entre o grupo vitrificado e cultivado. Outro estudo também em bovinos Jorssen et al. (2014) avaliando o efeito da tensão de oxigênio no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano, observou-se que o número de folículos marcados com vermelho neutro diminuiu ao longo do cultivo.

O corante azul de cresil possui uma atividade específica em relação a enzima glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH). Na presença desta enzima este corante pode ser reduzido a uma substância incolor. Desta forma, a taxa de redução da coloração corresponde ao nível de atividade da enzima G6PDH.

O corante marca o RNAm e quando a célula é marcada, significa que tem RNAm na célula, mas não está sendo traduzido resultando em pouca enzima (Lopes et al., 2006). Em estudo realizado por Yang et al. (2016) foi observado que complexos cumulos oócitos (CCOs) derivados de folículos antrais pequenos apresentavam marcação negativa para o corante, resultando em oócitos pouco capacitados para atingir a metáfase II.

#### **Metabolômica**

A metabolômica pode ser considerada como a tecnologia capaz de fornecer uma compreensão abrangente qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo (Hall, 2006). Com a metabolômica surgem novos olhares a respeito do entendimento da genômica funcional.

Em estudo com fluido folicular ovariano ovino Guo et al. (2018) avaliaram os efeitos metabólicos relacionados a via de sinalização do gene FecB (gene relacionado com a ovulação), observando que nesta via atuam vários metabólitos que repercutem diretamente no processo de ovulação nas diferentes espécies.

#### **Radioimunoensaio, ELISA e Quimioluminescência**

Este método usa o antígeno marcado radioativamente e anticorpos para determinar a concentração de antígenos com uma precisão bastante elevada, sendo bastante usada para a determinação da concentração de hormônios (Madeira et al., 2014).

O ELISA (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) se baseia na identificação de anticorpos e ou antígenos, por anticorpos marcados com uma enzima, de maneira que esta enzima age sobre um substrato e a reação faz com que o cromógeno mude de cor (Guimarães-Peixoto et al., 2015).

O método de quimioluminescência é uma técnica na qual se obtém energia luminosa por meio de uma reação química. Esse imunoensaio utiliza um sistema que se baseia em unidades-teste, recoberto com anticorpo específico, como ensaio em fase sólida, servindo como recipiente para a reação imune, a incubação, a lavagem e o desenvolvimento do sinal luminoso (Marchi et al., 2007).

Através destas avaliações podem ser realizadas a análise de diferentes substâncias no meio de cultivo *in vitro*. Essas substâncias ou componentes podem ser indicadores da eficiência do cultivo de FPs. O tópico abaixo explora alguns destes componentes.

#### **Secreção de outras substâncias foliculares durante o cultivo *in vitro* - Secretômica**

A secreção de esteróides reflete diretamente o desenvolvimento folicular *in vitro* (Lopes et al., 2015). A produção de estradiol pode ser um indicador da proliferação e diferenciação das células da granulosa.

No entanto, quando os folículos são cultivados individualmente a análise pode ser prejudicada devido a presença de poucas células, mesmo quando o volume do meio de cultivo for pequeno (Matos et al., 2007). Além disso, outras substâncias como a inibina, a ativina (Xu et al., 2009), o AMH (Campbell et al., 2012) e outros produtos metabólicos como dióxido de carbono (Boland et al., 1994) e lactato (Driancourt, 2001) podem ser liberados.

A inibina é uma glicoproteína produzida pelos folículos ovarianos e que tem sua atuação na hipófise. Ela é responsável por modular a liberação de FSH e atuar como um potente antagonista da ativina (Silva et al., 2014). A ativina pertence à superfamília do fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Knight e Glister, 2006). Nos ovários dos mamíferos a ativina participa de diversos eventos celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação e sobrevivência, além de estimular a produção de hormônios esteróides durante o desenvolvimento folicular (Knight e Glister, 2006). Em caprinos foi demonstrado que em folículos isolados cultivados por 18 dias, a adição de 50 ng/mL de ativina-A aumentou a taxa de crescimento folicular do dia 12 para o dia 18, resultando em maiores taxas de retomada da meiose (Silva et al., 2014). Em relação ao AMH, estudos indicam que este fator exerce um efeito inibitório no desenvolvimento de folículos em estádios iniciais (Durlinger et al., 1999). No entanto, o bloqueio da atividade deste fator em ovelhas através de imunização não afetou a taxa de ativação de folículos primordiais (Campbell et al., 2012). Em caprinos, cultivando folículos inclusos em fragmentos ovarianos foi observado que na presença de AMH, após 7 dias de cultivo, o percentual de folículos em desenvolvimento foi similar ao encontrado no controle não-cultivado. Entretanto, quando os folículos foram cultivados isoladamente por 18 dias na presença de AMH ou AMH associado ao FSH, foi observado uma redução na taxa de crescimento quando comparados ao controle (Rocha et al., 2016).

Em estudo realizado por Araújo et al. (2014) com FPs bovinos isolados cultivados por 32 dias e encapsulados em matriz de alginato (0.25%) foi observado uma maior concentração de estradiol na presença de 50 ng/mL do hormônio do crescimento (GH). Outro trabalho realizado por Chaves et al. (2012) foi demonstrado que FPs caprinos cultivados por 18 dias na presença de insulina (10 ng/mL) e FSH sequencial (Dia 0 = 100 ng/ml; Dia 6 = 500 ng/ml; Dia 12 = 1000 ng/ml) apresentaram maiores taxas de produção de estradiol.

A produção esteroidogênica, bastante analisada entre os trabalhos, pode ser avaliada durante ou ao final do período de cultivo, através de técnicas como o radioimunoensaio ou ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA). Para esta metodologia o meio de cultivo coletado pode ser armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análise (Lopes et al., 2015).

## Considerações finais

As técnicas de avaliação do cultivo in vitro permitem o monitoramento da qualidade folicular antes e após o cultivo. A utilização destas técnicas pode auxiliar no desenvolvimento de protocolos que possam melhorar os sistemas de crescimento in vitro de FPs, para que se tenham oócitos aptos a serem maturados e fecundados in vitro. Deste modo, os oócitos oriundos destes folículos poderão ser utilizados em outras técnicas relacionadas à reprodução animal. Diversas técnicas invasivas e não invasivas têm sido utilizadas com essa finalidade. No entanto, a união de um ou mais parâmetros ou técnicas de avaliação da qualidade folicular é o que torna mais precisa a interpretação da qualidade e da viabilidade folicular.

## Referências

- Abir R, Nitke S, Ben-Haroush A, Fisch B (2006). In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histology and Histopathology*, 21, 887-898.
- Agnello M, Morici G, Rinaldi AM (2008). A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*, 56, 145-149.
- Araújo VR, Gastal MO, Wischral A, Figueiredo JR, Gastal EL (2014). In vitro development of bovine secondary follicles in two- and three-dimensional culture systems using vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone. *Theriogenology*, 82, 1246-1253.
- Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH (2010). Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, 74, 884-894.
- Atwood CS, Meethal SV (2016). The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis early embryogenesis and blastocyst implantation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 430, 33-48.
- Barnett KR, Schilling C, Greenfield CR, Tomic D, Flaws JA (2006). Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction Update*, 12, 537-545.
- Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG (1994). Characterisation of follicular energy metabolism. *Human Reproduction*, 9, 604-609.
- Brito IR, Silva CMG, Duarte ABG, Lima IMT, Rodrigues GQ, Rossetto R (2014). Alginate hydrogel matrix stiffness influences the in vitro development of caprine preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 81, 636-645.
- Campbell BK, Clinton M, Webb R (2012). The role of anti-mullerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (sheep). *Endocrinology*, 153, 4533-4543.
- Canipari R (2000). Oocyte-granulosa cell interactions. *Human Reproduction Update*, 3, 279-289.

- Celestino JJH, Bruno JB, Lima-Verde IB, Matos MH, Saraiva MV, Chaves RN (2010). Steady state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 77, 231-240.
- Celestino JJH, Lima-Verde IB, Bruno JB, Matos MHT, Chaves RN, Saraiva MVA (2011). Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on in vitro development and survival of preantral follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 338, 1-9.
- Chaves RN, Duarte AB, Rodrigues GQ, Celestino JJ, Silva GM, Lopes CA (2012). The effects of insulin and follicle-stimulating hormone (FSH) during in vitro development of ovarian goat preantral follicles and the relative mRNA expression for insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles. *Biology of Reproduction*, 87, 69.
- Demeestere I, Centner J, Gervy Y, Delbaere A (2005). Impact of various endocrine and paracrine factors on culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, 130, 147-156.
- Derenzini M, Trere D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P (2000). Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *The Journal of Pathology*, 191, 181-186.
- Driancourt MA (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55, 1211-1239.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels BFH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 140, 5789-5796.
- Erickson GF (1986). An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin Reprod Endocrinol*, 4, 233-244.
- Ferro AB (2014). Imunohistoquímica. In: Ferro AB, 1ª edição. Editor: Ferro AB. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (Lisboa), 1-3.
- Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV (2007). Importância da biotécnica de Moifopa para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. *Revista brasileira de reprodução animal*, 31, 143-152.
- Figueiredo JR, Lima LF, Silva JRV, Santos RR (2018). Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. *Animal Reproduction* (Aceito para publicação).
- Fotakis G, Timbrell JA (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171-177.
- Fu Q, Huang Y, Wang Z, Chen F, Huang D, Lu Y (2016). Proteome profile and quantitative proteomic analysis of buffalo (*Bubalus bubalis*) follicular fluid during follicle development. *International Journal of Molecular Sciences*, 618-617.
- Glister C, Richards SL, Knight PG (2005). Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology*, 146, 1883-1892.
- Gouveia BB, Barros VRP, Gonçalves RJS, Barberino RS, Menezes VG, Lins TLB (2015). Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. *Animal Reproduction*, 12, 316-323.
- Govindaraj V, Rao AJ (2015). Comparative proteomic analysis of primordial follicles from ovaries of immature and aged rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 6, 367-375.
- Guerreiro DD, Lima LF, Mbemya GT, Maside CM, Miranda AM, Tavares KCS (2018). ATP-binding cassette (ABC) transporters in caprine preantral follicles: gene and protein expression. *Cell and Tissue Research*, 372, 611-620.
- Guimarães-Peixoto RPM, Pinto PSA, Nero LA, Santos TO, Silva LF, Acevedo-Nieto EC (2015). Desempenho do ELISA no diagnóstico da cisticercose utilizando bovinos experimentalmente e naturalmente infectados com o metacésteo de *Taenia saginata*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 36, 807-816.
- Guo X, Wang X, Di R, Liu Q, Hu W, He X (2018). Metabolic effects of fecb gene on follicular fluid and ovarian vein serum in sheep (*Ovis aries*). *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 539.
- Gupta PSP, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP (2008). Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. *Zygote*, 16, 57-63.
- Hall RD (2006). Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, 169, 453-468.
- Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM (2014). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, 1-26.
- Jorssen EPA, Langbeen A, Fransen E, Martinez EL, Leroy JLMR, Bols PEJ (2014). Monitoring preantral follicle survival and growth in bovine ovarian biopsies by repeated use of neutral red and cultured in vitro under low and high oxygen tension. *Theriogenology*, 82, 387-395.
- Knight PG, Glister C (2006). TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132, 191-106.
- Langbeen A, Jorssen EPA, Granata N, Fransen E, Leroy JLMR, Bols PEJ (2014). Effects of neutral red assisted viability assessment on the cryotolerance of isolated bovine preantral follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31, 1727-1736.
- Lima LF, Bruno JB, Rodrigues APR, Figueiredo JR (2016). Papel da homeopatia na regulação da

- foliculogênese in vivo e in vitro. *Reprodução & climatério*, 2, 112-119.
- Lima LF, Rocha RM, Alves AM, Saraiva MV, Araújo VR, Lima IM, Lopes CA, Bão SN, Campello CC, Rodrigues AP, Figueiredo JR (2013). Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured in vitro. *Homeopathy*, 102, 41-48.
- Lins TLBG, Cavalcante AYP, Santos JMS, Menezes VG, Barros VRP, Barberino RS, Bezerra MES, Macedo TJS, Matos MHT (2017). Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. *Theriogenology*, 89, 263-270.
- Liu J, Van Der Elst, J, Van Den Broeck R, Dhont M (2001). Live offspring by in vitro oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biology of Reproduction*, 64, 171-178.
- Lopes PR, Furtado PV, Souza RHFA, Oliveira CA (2015). Importância e metodologias para mensuração dos esteroides sexuais em ruminantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 39, 322-328.
- Lopes STA, Maciel RM, Franciscato C, Emanuelli MP, Rivera RS, Mazzanti A, Teixeira LV (2006). Reticulócitos e hematócrito de cães pré e pós esplenectomia parcial. *Ciência Rural*, 36, 1000-1003.
- Madeira JLO, Bussmann LZ, Lima-Valassi HP, Mendonça BB (2014). Análise de um radioimunoensaio iodado para determinação de 11-deoxicortisol. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 58, 3.
- Magalhães DM, Duarte ABG, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IMT, Lopes CA, Campello CC, Rodrigues AP, Figueiredo JR (2011). In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, 75, 182-188.
- Magalhães-Padilha DM, Geisler-Lee J, Wischral A, Gastal MO, Fonseca GR, Eloy YRG (2013). Gene expression during early folliculogenesis in goats using microarray analysis. *Biology of Reproduction*, 89, 1-12.
- Mahmood T, Yang PC (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. In: *North American Journal of Medical Sciences*, 9a edição. 429-434.
- Mao J, Wu G, Smith MF (2002). Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biology of Reproduction*, 67, 1197-1203.
- Marchi CR, Neto VA, Almeida IC (2007). Comportamento do método quimioluminescente-ELISA em relação a resultados considerados discordantes por meio de três técnicas convencionais para diagnóstico da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 68-70.
- Martins FS, Celestino JJH, Saraiva MVA, Matos MHT, Bruno JB, Rocha-Junior CMC Lima-Verde IB, Lucci CM, Bão SN, Figueiredo JR (2008). Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, 20, 916-924.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia JRJE, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Bão SN, Lucci CM, Figueiredo JR (2007). Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*, 15, 173-182.
- Mcgee EA, Hsueh AJ (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21, 200-204.
- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ (2006). Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of andrology*, 27, 201-211.
- Nordberg J, Arnér ES (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 1287-1312.
- O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ (2003). A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biology of Reproduction*, 8, 1682-1686.
- Peng X, Wang L, Yang M, Chen T, Guo Z (2010). Effect of ascorbic acid, epidermal growth factor and follicle stimulating hormone on in vitro culture of sheep ovarian cortical tissue. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 26, 744-752.
- Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL (2008). The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, 136, 703-715.
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 319, 611-613.
- Rocha RM, Lima LF, Carvalho AA, Chaves RN, Bernuci MP, Rosa-e-Silva AC (2016). Immunolocalization of the Anti-Müllerian Hormone (AMH) in Caprine Follicles and the Effects of AMH on In vitro Culture of Caprine Pre-antral Follicles Enclosed in Ovarian Tissue. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 212-219.
- Rosa GJM, Rocha LB, Furlan LR (2007). Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 185-209.
- Rota C, Chignell CF, Mason RP (1999). Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress

- measurements. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 873-881.
- Sá NAR, Araújo, VR, Correia HHV, Ferreira ACA, Guerreiro DD, Sampaio AM (2017). Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology*, 89, 226-234.
- Sales AD, Duarte ABG, Rodrigues GQ, Lima LF, Silva GM, Carvalho AA (2015). Steady-state level of messenger RNA and immunolocalization of aquaporins 3, 7, and 9 during in vitro growth of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, 84, 1-10.
- Saraiva MV, Celestino JJ, Araújo VR, Chaves RN, Almeida AP, Lima-Verde IB (2010). Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on in vitro development of caprine preantral follicles. *Zygote*, 19, 205-214.
- Silva AMS, Bruno JB, Lima LF, Sá NAR, Lunardi FO, Ferreira ACA, Vieira Correia HH, de Aguiar FL, Araújo VR, Lobo CH, Moura AAA, Campello CC, Smitz J, de Figueiredo JR, Ribeiro Rodrigues AP (2016). Connexin 37 and 43 gene and protein expression and developmental competence of isolated ovine secondary follicles cultured in vitro after vitrification of ovarian tissue. *Theriogenology*, 85, 1457-1467.
- Silva GM, Rossetto R, Chaves RN, Duarte ABG, Araújo VR, Feltrin C (2014). In vitro development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. *Zygote*, 23, 475-484.
- Silva JRV, Van Den Hurk R, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lôbo RN, Figueiredo JR (2004). Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, 81, 273-276.
- Silva RF, Brito IR, Lima LF, Aguiar FLN, Rodrigues GQ, Nascimento ILC, Rocha RMP, Cibin FWS, Wheeler MB, Campello CC, Rodrigues APR, Figueiredo JR (2017). Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) improves follicular survival, oocyte and follicular diameters, in a dose-dependent manner, after the in vitro culture of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue fragments. *Animal Reproduction*, 14, 1095-1102.
- Telfer EE, Mclaughlin M (2011). In vitro Development of Ovarian Follicles. *Seminars in Reproductive Medicine*, 29, 15-23.
- Xu M, West-Farrell ER, Stouffer RL, Shea LD, Woodruff TK, Zelinski MB (2009). Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biology of Reproduction*, 81, 587-594.
- Yang M, Hall J, Fan Z, Regouski M, Meng Q, Rutigliano HM (2016). Oocytes from small and large follicles exhibit similar development competence following goat cloning despite their differences in meiotic and cytoplasmic maturation. *Theriogenology*, 86, 2302-2311.

## Supplementation with corn silage improves index and body condition while not affecting first third of gestational status in mares

### Suplementação com silagem de milho melhora índices e condição corporal de éguas sem afetar o terço inicial do estado gestacional

Kate M.C. Barcelos<sup>1\*</sup>, Adalgiza S.C. Rezende<sup>2</sup>, José Maria F. Taitson<sup>3</sup>, Diogo Felipe S. Inácio<sup>2</sup>, Debora C. Basto<sup>1</sup>, Naiara C. Silva<sup>1</sup>, Rafael Henrique P. Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, 74.001-970, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. <sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo Autônomo, Pará de Minas, Minas Gerais, Brasil.

**Abstract:** This study aimed to assess the influence of supplementation with corn silage on the body condition and overall welfare of mares in the first third of gestation during the dry season in the Brazilian Southeast region, in order to demystify the use of this feed in equines at this stage in the tropical countries. To that end, ten pregnant Mangalarga Marchador mares whose average age was 7 years were used. The animals were kept in a paddock and received corn silage supplementation in individual troughs. Before and after the experimental period, body weight, body mass index, two body condition scores, fat score on the crest of the neck, two measures of subcutaneous fat thickness, chest circumference, neck circumference, and fortnightly gestational development monitoring. Measurements were carried out at the beginning of the experiment and after 12 weeks of the first assessment. Paired t-test, Wilcoxon test, and Spearman's correlations were applied. Weight gain, subcutaneous fat thickness in the regions of the rump and tail insertion point, and body condition, and crest neck scores increased ( $p < 0.05$ ). Supplementation with corn silage in the dry season (84 days) improved body indices and the body condition of mares, while not affecting gestational condition, therefore it can be used in this category with no harm to animal well-being.

**Resumo:** Objetivou-se avaliar a influência da suplementação com silagem de milho na condição corporal e no bem-estar geral de éguas no primeiro terço da gestação durante a estação seca na região Sudeste do Brasil, a fim de desmistificar o uso desta suplementação em equinos, neste período, em países tropicais. Para tanto, foram utilizadas 10 éguas Mangalarga Marchador, em terço inicial de gestação, com idade média de 7 anos. Os animais foram mantidos em piquete e receberam suplementação de silagem de milho em cochos individuais. Antes e após o período experimental foram avaliados peso corporal, índice de massa corporal, dois escores de condição corporal, escore de gordura na crista do pescoço, duas medidas de espessura de gordura subcutânea, circunferência torácica, circunferência do pescoço. As medições foram realizadas no início do experimento e após 12 semanas da primeira avaliação. Sendo também realizado monitoramento quinzenal do desenvolvimento gestacional. O teste t pareado, o teste de Wilcoxon e as correlações de Spearman foram aplicados. O ganho de peso, a espessura da gordura

subcutânea nas regiões de garupa e de inserção da cauda, a condição corporal e os escores da crista do pescoço aumentaram ( $p < 0.05$ ). A suplementação com silagem de milho na estação seca (84 dias) auxiliou na melhora dos índices corporais e na condição corporal das éguas sem afetar a condição gestacional, podendo, portanto, ser utilizada nesta categoria sem prejuízo ao bem-estar animal.

\*Correspondência: kate@ufg.br

#### Introduction

According to "Welfare Quality" (Manteca et al., 2013), animal welfare includes: a good diet, good shelter, good health, and appropriate behaviour. The body condition score (BCS) of a mare can be an important indicator towards equine welfare, in addition to monitoring her health, reproductive function and persistence of gestation.

In mares, predictions of body fat (BF, %) are useful in achieving maximum reproductive efficiency, cost-effective nutritional management, and management of obesity-related health condition (Canvinder et al., 2018). However, maintaining the body condition in the dry season is difficult in tropical regions, due to the reduction of the quantity and quality of forage because the factors that affect plant growth (e.g., temperature, luminosity, and rainfall) are decreased in this season. This limits the supply of food to animals, requiring the provision of other sources of fodder for grazing animals.

In Brazil, there are two well-defined climatic seasons: the wet season and the dry season. During the dry season, when pasture growth declines due to the lack of rainfall, the use of conserved forages for equine supplementation is very important. Silages are widely employed for ruminants' sources of forage in dry season, because they are the most economical option for forage supplementation in Brazil. However, it is used with caution for equines since they are still



considered potential causes of veterinary issues such as possible contamination with mycotoxins, mould spores, toxin botulin and other microbes (Müller, 2018). In addition, adverse effects may include respiratory disease, colic and other gastrointestinal illness, mycotoxicosis and intoxications (Kamphues, 2013). Although, Tosi *et al.* (1979), corn silage can be freely provided to horses, and Meyer (1995) suggests replacing up to 50% of the amount of hay offered. Studies with corn and low-tannin sorghum silage did not show harmful effects of their intake and digestibility in foals (Santos *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2007; Gollcher *et al.*, 2010) also when used as a diet complement allowed normal growth and development of fillies (Inácio *et al.*, 2018). Therefore, corn silage may be an alternative to maintain horses healthy and in good body condition during the dry season of the year.

One way of assessing the nutritional status is the BCS, which has been a useful tool given its convenience and quick determination. The scale of BCS ranges between 1 (very lean) and 9 (obese) (Henneke *et al.*, 1983), or 0 (very lean) and 5 (obese) (Carroll and Huntington, 1988). The BCS 5 (moderate) in the scale by Henneke *et al.* (1983) is considered ideal by the NRC (2007) for the reproductive performance of mares. According to Henneke *et al.* (1984), mares that entered estrus with moderate BCS had higher conception rates than leaner ones, while the latter had longer intervals between births and a higher number of cycles per conception. Rodrigues *et al.* (2011) studied the relation between body fat measured through ultrasound and the reproductive efficiency of Mangalarga Marchador mares and concluded that the BCS directly impacted ovulatory follicle diameter and the proportion of recovered embryos. However, it is necessary to determine the effect of feeding corn silage on BCS and persistence of gestation in pregnant mares.

Our hypothesis is that when silage is properly produced and provided to the pregnant mares, it represents a convenient and viable alternative for maintain horses healthy, in good body and persistence of gestation in dry season. Therefore, this study aimed to assess the influence of supplementation with corn silage on the body condition evaluated for several body index and overall welfare of mares in early gestation during the dry season in the Brazilian Southeast region.

## Material and Methods

### Experimental animals and feeding

The experiment was conducted in São Sebastião Farm, in the city of Pará de Minas, MG, Brazil. The study sample consisted of ten Mangalarga Marchador pregnant mares (12 at 25 days of pregnancy). The mares were  $6.8 \pm 1.9$  years old and weighed  $340 \pm 30.5$  kg (Appendix 1). After the animals underwent deworming (Ivermectin) and had an anti-tick shower (Deltamethrin), the pre-experimental phase began,

lasting 15 days for adaptation to the diet. The mares were kept in the same paddock, with *Cynodon dactylon* cv. African Star grass, and were supplemented corn-silage (Table 1) in individual feeding troughs, twice per day. Corn silage was made on-farm and was gradually introduced until daily intake per animal reached at least 5 kg, dry matter basis. After the first 15 days, they were feed just corn-silage, because there was no more forage for grazing in the paddock. Mineral salt and water were provided *ad libitum*. The chemical composition of the silage was analyzed at the Animal Nutrition Laboratory of UFMG's Veterinary School, according to Detmann *et al.* (2012). Diary the silage was visually assessed in each feed for presence of fungi, physical contaminants, moisture, color, and odor.

Table 1. Bromatological composition of corn silage produced and used in São Sebastião Farm expressed in dry matter.

GE	DM	OM	CP	EE	NDF	ADF	HEM	MM	Ca	P
Mcal/kg of	% of									
DM	DM									
3.96	30	951	73.6	33.4	449	196	253	49.0	2.30	1.90

DM - dry matter; OM = organic matter; CP = crude protein; EE = ethereal extract; MM = mineral matter; NDF = neutral detergent fiber; ADF = acid detergent fiber; GE = gross energy (PARR adiabatic bomb calorimeter); HEM = hemicelluloses; Ca = calcium; P = phosphorus.

### Welfare assessment

The mares' clinical condition was assessed by the veterinary in charge both before and during the adaptation phase. After that, the mares were also evaluated for: clinical parameters (heart rate, respiratory rate, rectal temperature, skin turgor, capillary filling time, mucosal color, digital pulse, hoof temperature, response to hoof tester) and submitted to clinical and behavior evaluation (food intake, gastrointestinal motility evaluation, fecal color and consistency, social interaction) looking for signs of colic or any behavior disorders, dairy. They were submitted to complete clinical evaluation for lameness and neurological disorders, weekly. They were also observed three times a day, during 30 min each time, to assess whether the five freedoms proposed by Brambell (1965) were achieved. According to Brambell (1965), the animal should be: (1): free from hunger, thirst and malnutrition; (2): free from physical and thermal discomfort; (3): free from pain, injury and disease; (4) able to express most of its normal behavioral patterns, (5): it should not experience fear or distress.

### Body condition, body index and pregnancy

All mares were at the same health status at the beginning of the trial. In the experimental period (August to November 2013), two assessments were performed, on day 1 (after the adaptation phase) and on day 84 (12 weeks after the first assessment), which coincided with the end of the dry season. Besides the clinical examination, transrectal ultrasound exams were performed every fortnight in order to assess

development and to verify whether the mares had lost the embryos.

Body weight was measured using a commercial weight tape for horses (Vetnil®, São Paulo, Brazil), following the formula proposed by Carroll and Huntington (1988) for saddle horses: body weight (kg) = (TP × BL)/11,900, where TC is thoracic circumference and BL is body length, both in cm. Body mass index (BMI), calculated through the formula BMI = weight (kg)/height<sup>2</sup> (Donaldson *et al.*, 2004). Body condition through BCS using two different scales: from 1 to 9 (Henneke *et al.*, 1983), with the ideal score at 5; and from 0 to 5 (Carroll and Huntington; 1988), whose ideal score for mares in maintenance is 3, and through the crest neck score (CNS) by Carter *et al.* (2009), assessing adiposity above the nuchal ligament with a scale from 0 to 5 in which 3 is the ideal score. Neck circumference at its insertion point with the thorax (NCI) and at the medial portion (NCM), the latter calculated as half the neck's length with the animal relaxed while standing. The perimeters were measured by measuring tape in centimeters. Measurements of height and length were performed by an experienced evaluator with a hipometer, in the left side of the horse.

Body composition, determined from the body mass (kg), measured with the same commercial weight tape (Vetnil®, São Paulo, Brazil), associated with rump fat determined with ultrasound (Mindray 2200 Vet, DPS®), which employed a 5 mHz linear transducer placed perpendicularly to the mean point between the ileum and ischium and at 10,0 cm to the side of the mean body line. The body's subcutaneous adipose tissue (SAT) was obtained through the equation 8.64 + (4.70 \* SFT rump), where SFT rump is the subcutaneous fat thickness (SFT) measured at the rump, in cm (r<sup>2</sup> = 0.86, CV = 2.40%), according to Westervelt *et al.* (1976). Ultrasound analyses were also carried out in two fat storage regions, i.e., the rump (SFT rump, described above) and the tail insertion point region (SFT tail), located 5 cm to the side of the mean line (sacrum) and 7 cm cranial to the tail's insertion point. All ultrasound procedures employed a 5 mHz linear transducer on previously trichotomized regions and the images were verified by the same assessor in both analyses.

**Statistical analysis**

The software BioEstat 5.0 was used to compare the variables using paired T-test, except for the scores, to which Wilcoxon test was applied. Spearman correlations were also performed between the morphometric measures and the scores. The significance level was of 5% for all variables.

**Results**

All mares were at the same health status at the beginning of the trial, and no embryo development issues, or loss occurred. In other words, 100% of mares had normal embryo development.

During the experimental period, there was no gastrointestinal disorders, no signs of lameness or laminitis in the mares. The animals' overall appearance improved by the end of the trial, their natural behavior remained the same throughout the trial, the five freedoms (Brambell, 1965) were visually satisfied. The only occurrence was feces softening in four animals during the first week of adaptation along with mild increase in peristaltic movements in these animals, which was over by the end of that same week. No other clinical changes were observed.

No signs of contamination for mycotoxins was observed visually (low silage intake, symptoms of neurological or behavioral disorders, signs of colic).

All parameters for fat accumulation increased in the second evaluation (Table 2) and will be detailed in the discussion.

Table 2. Means of body weight measured with a tape (Wtape) and formula (Wformula), thoracic circumference (TC), neck circumference measured at the insertion point at the thorax (NCI), and at the medial portion (NCM), body mass index (BMI), fat thicknesses determined through ultrasound (SFT), body fat percentage, body condition score (BCS) on the scales from 0 to 5 and 1 to 9 and the crest neck score (CNS) on the scale from 0 to 5 before and after the experimental period.

Variable	Before	After
Wtape, kg	360 <sup>b</sup>	394 <sup>a</sup>
CV (%) <sup>1</sup>	13.2	11.5
Wformula, kg	333 <sup>b</sup>	351 <sup>a</sup>
CV (%)	11.9	12.2
TC, cm	165 <sup>b</sup>	169 <sup>a</sup>
CV (%)	4.90	4.94
NCI, cm	110 <sup>b</sup>	112 <sup>a</sup>
CV (%)	5.35	4.93
NCM, cm	84.9 <sup>b</sup>	90.9 <sup>a</sup>
CV (%)	7.25	5.85
SFT rump, mm	5.40 <sup>b</sup>	9.91 <sup>a</sup>
CV (%)	16.6	24.6
SFT tail, mm	7.10 <sup>b</sup>	16.6 <sup>a</sup>
CV (%)	52.8	25.9
BMI	711 <sup>b</sup>	749 <sup>a</sup>
CV (%)	15.2	15.7
Body fat percentage	11.2 <sup>b</sup>	13.3 <sup>a</sup>
CV (%)	11.4	8.61
*BCS 0-5 <sup>2</sup>	3.0 <sup>b</sup>	3.4 <sup>a</sup>
*BCS 1-9 <sup>3</sup>	4.8 <sup>b</sup>	6.1 <sup>a</sup>
*CNS 0-5 <sup>4</sup>	2.1 <sup>b</sup>	3.5 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>CV: Coefficient of variation. Different letters on the same line differ by paired T-test (p< 0.05).

<sup>2</sup>Carroll and Huntington (1988); <sup>3</sup>Henneke (1983); <sup>4</sup>Carter *et al.* (2009).

\*Different letters on the same line differ by Wilcoxon test (P<0.05).

There is a high correlation between BCS 0 to 5 and Wformula (r = 0.9045). BCS 1 to 9 was also strongly correlated with Wformula (r = 0.7856) (Table 3).

**Discussion**

The mares' body weight significantly increased (p < 0.05) either as measured through the tape (Wtape) or the formula (Wformula) (Table 2).

Table 3. Correlation coefficient among the variables studied.

	BCS 0 to 5 <sup>2</sup>	BCS 1 to 9 <sup>3</sup>	CNS 0 to 5 <sup>4</sup>
Wformula	0.9045	0.7856	0.8704
P <sup>1</sup>	< 0,001	0,007	0,001
SAT, %	0.8648	0.7037	0.8593
P	0,001	0,020	0,001
BMI	0.8350	0.7856	0.8008
P	0,001	0,007	0,003
SFT rump, mm	0.8544	0.7670	0.8799
P	0,002	0,010	< 0,001
SFT tail, mm	0.6310	0.5726	0.6011
P	0,050	0,083	0,066

Wformula = weight measured with formula; SAT = subcutaneous adipose tissue; BMI = body mass index; SFT rump = fat thicknesses determined through ultrasound in the rump; SFT tail = fat thicknesses determined through ultrasound in the tail.

<sup>1</sup>P = probability. <sup>2</sup>Carroll and Huntington (1988); <sup>3</sup>Henneke (1983); <sup>4</sup>Carter et al. (2009).

Mean weight gain was 33.9 kg (9.43%) as measured by the weight tape and 17.8 kg (5.34%) as measured by the formula by Carroll and Huntington (1988). In the present study, the measures showed mares' body condition improved with corn silage supplementation (Table 2). Body condition is acknowledged as an indicator of the management of the animals' energy stores (Gobesso et al., 2013). In the trial, the mares' body condition improved, indicated by the higher ( $p < 0.05$ ) BCS, on both scales, and crest neck score (CNS) (Table 2). CNS can also be used to assess fat deposition, as can the neck circumference measure. These measures, when associated with the blood variables of leptin and insulin levels, are correlated with the risk of laminitis when CNS is higher than 3, according to Carter et al. (2009). However, CNS above 3 associated with the increase in neck circumference measures were not correlated with the occurrence of clinical laminitis in this trial and the animals, despite the increase in fat mass, remained healthy. A strong correlation was found between CNS and BCS 0 to 5 ( $r = 0.90$ ) and between CNS and BCS 1 to 9 ( $r = 0.8696$ ), both at  $p < 0.05$ , which confirms that all these measures can be precisely used to control body condition in horses.

The measures of TC, NCI, and NCM also increased ( $p < 0.05$ ) during the experimental period. NCI was correlated at 0.8730 and NCM, at 0.8293 ( $p < 0.05$ ) (Table 2). Since the mares are adult, such increase might have showed a greater fat deposition at the sites measured (Henneke et al., 1983).

There is a high correlation between BCS 0 to 5 and Wformula ( $r = 0.9045$ ). BCS 1 to 9 was also strongly correlated with Wformula ( $r = 0.7856$ ), unlike the weak correlation of 0.1530 reported by Gobesso et al. (2013). The correlation of CNS with weight was also strong ( $r = 0.8704$ ). As with weight, BCS 0 to 5 is better correlated with the SAT and BMI than the other scores, proving it is more effective in assessing the body condition of mares. In Brazil, the BCS 1 to 9 is limited to teaching and research institutions. In general, the BCS 0 to 5 is more accepted by breeders and professionals being preferred for use on the farms.

Muscle body composition and fat deposition, as is the case in humans, are great performance indicators for horses. Westervelt et al. (1976) were the first

authors to study the determination of the body fat percentage in horses through the subcutaneous fat tissue thickness. In the present experiment, the body fat percentage increased ( $p < 0.05$ ) by 2.12 percentage points or 18.96% compared to the body fat percentage in the beginning of the trial, which shows the mares' fat deposition considerably increased by the end of the trial (Table 2). Gobesso et al. (2013) suggested that the tail insertion point might be a good site to assess body fat in horses since it is strongly correlated with BCS. However, the rump region had a stronger correlation with BCS than the tail region in the present trial (Table 3).

BMI significantly differed ( $p < 0.05$ ) over the experimental period and was strongly correlated with BCS on both scales. Similar data were found by Donaldson et al. (2004), who reported a correlation of 0.60 between BMI and BCS 1 to 9. Therefore, BMI also becomes an important index to measure body fat. The body condition scores on both scales assessed, i.e., CNS and BMI, are strongly correlated with body fat percentage, hence they are good tools to assess the animals' nutritional status. Fat percentage and BMI were moderately correlated at 0.6763 ( $p = 0.0317$ ), which suggests that the BMI may be a good indicator of the animals' body condition.

Supplementation with corn silage in the dry season improved the body indices by increasing subcutaneous fat deposition in the animals, which consequently improved their body condition due to the greater amount of energy provided by the diet. It is important to highlight that the mares' gestational status was not affected, thus corn silage can be used with expecting animals with no harm to their welfare. The animals' overall appearance improved by the end of the trial, their natural behavior remained the same throughout the trial, the five freedoms were satisfied, and no embryo development issues, or loss occurred.

There are differences between the acceptability of silage compared to other conserved forages and even between different types of silage. In some experiments, low dry matter intake of sorghum silage has been reported compared to *Cynodon* sp. hay (Silva et al., 2019) and low dry matter intake of sorghum silage compared to corn silage and hermatia grass silage (*Hermathria altissima*) (Melo et al., 2011). In animals kept in a pen, the lower dry matter intake can increase the leisure time, which can predispose to stereotypic behaviors (Silva et al., 2019). Then, other experiments must be carried out to evaluate the effects of different types of silage on the behavior and well-being of horses for a longer period of time.

## Conclusion

The supplementation with corn silage in the dry season (84 days) can improved body indices and the body condition of mares while not affecting the gestational condition, therefore it can be used in this category with no harm to animal well-being.

**Acknowledgements:** Dr. Sarah L. Ralston for the English version, and São Sebastião Farm for the place, silage.

## References

- Brambell, F. W. R (1965). Report of the Technical Committee of Enquiry into the Welfare of Livestock Kept under Intensive Conditions; HMSO: London, UK.
- Cavinder, C. A.; Ferjak, E. N.; Phillips, C. A.; Burnett, D. D.; Dinh, T. T. N. (2018). Review: The importance of overall body fat content in horses. *The Professional Animal Scientist*, 20(2), 125-132.
- Carroll, C. L.; Huntington, P. J. (1988). Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Veterinary Journal*, 20(1), 41-45.
- Carter, R. A.; Geor, R. J.; Staniar, W. B.; Cubitt, T. A.; Harris, P. A. (2009). Apparent adiposity assessed by standardized scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Veterinary Journal*, 179(2), 204-210.
- Detmann, E.; Souza, M. A.; Valadares Filho, S. C.; Queiroz, A. C.; Berchielli, T. T.; Saliba, E. O. S.; Cabral, L. S.; Pina, D. S.; Ladeira, M. M.; Azevedo, J. A. G. (2012). Métodos para análises de alimentos. INCT- Ciência animal. UFV.
- Donaldson, M.; Mcfarlane, D. Jorgensen, A. (2004). Correlation between plasma $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone concentration and body mass index in healthy horses. *American Journal Veterinary Research*, 65(11), 1469-1473.
- Golcher, A. M. R.; Lima, J. A. F.; Fialho, E. L.; Rodrigues, P. B.; Lima, R. R. (2010). Nutritional value of high and low tannin high-moisture sorghum grain silage in horses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(6), 1246-1251.
- Gobesso, A. A. O.; Françoso, R.; Toledo, R. A. D.; Centini, T. N.; Gonzaga, I. V. F.; Gil, P. C. N.; Baldi, F. (2013). Evaluation of body condition score in horses by ultrasonography. *Forages and grazing in horses nutrition*. EAAP, 132, 387-390.
- Henneke, D. R.; Potter, G. D.; Kreider, J. L.; Yeates, B. F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15 (4), 371-372.
- Henneke, D. G.; Potter, G. D.; Kreider, J. L. (1984). Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, 21(6), 897-909.
- Inácio, D. F. S.; Rezende, A. S. C.; Silva, R. H. P.; Melo, M. M.; Mendes, L. J.; Maruch, S.; Barcelos, K. M. C.; Lana, A. Q.; Ralston, S. A.; (2018). The use of sorghum silage in feeding weanling horses: Body Development. *Livestock Science*. 215,46-48.
- Kamphues, J. (2013). Feed hygiene and related disorders in horses. In: *Equine applied and clinical nutrition*. Editores: RJ Geor, PA Harris, M Coenen. Elsevier (Amsterdam, The Netherlands), 367–380.
- Manteca, X.; Silva, C. A.; Bridi, A. M.; Dias, C. P. (2013). Animal welfare: concepts and practical procedures to evaluate the swine productions systems. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(6), 4213-4230.
- Melo, H. A.; Dittrich, J. R.; Swaroski, D.; Moressi, G. B.; Cabreira, R. S.; Gazda, T. L.; Monteiro, A. L. G.; Oliveira, S. G.;Dittrich, R. L.; Silva, A. L. P. (2011). Behavior and food preference of Mangalarga Marchador mares fed with maize, sorghum and limp grass silages. *Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais*, 9(4), 387-393.
- Meyer, H (1995). Alimentação de cavalos. Tradução por Stéfano Hagen. São Paulo: Varela. 303 p.
- Müller, C. E. (2018) Silage and haylage for horses. *Grass and Forage Science*, 36(4), 815-827.
- National Research Council – NRC (2007). Nutrient Requirements of Horses, 6th revised, (Washington DC), 1- 341.
- Oliveira, K.; Costa, C.; Faustino, M. G.; Gasque, V. S.; Santos, V. P.; Lima, M. N.; Nascimento Filho, V. F.; Abdalla; A. L. (2007). Valor nutritivo e estudo cinético do trato digestivo de dietas contendo grãos secos ou ensilados de sorgo de baixo e alto tanino para equinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(6), 1809-1819.
- Rodrigues, P. G.; Raymundo, C. M.; Souza, J. C.; Miranda, M. C. M. G.; Rezende, A. S. C. (2011). Gordura corporal e eficiência reprodutiva em éguas doadoras de embrião mangalarga marchador. *Ciência e agrotecnologia*, 35(5), 1002 -1008.
- Santos, C. P.; Furtado, C. E.; Jobim, C. C.; Furlan, A. C.; Mundim, C. A.; Graça, E. P. (2002). Avaliação da silagem de grãos úmidos de milho na alimentação de equinos em crescimento: valor nutricional e desempenho. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(3), 1214-1222.
- Silva, R. H. P.; Rezende, A. S. C.; Inacio, D. F. S.; Norberto, F.; Queiroz, J. N. S. M.; Moreira, D. C. A.; Mendes, L. J.; Peixoto, J. L.; Cristeli, J. H. (2019). Feeding behavior of Mangalarga Marchador weanlings fed sorghum silage versus grass hay. *Journal of Equine Veterinary Science*, 75, 90-92.
- Tosi, H.; Silveira, A. C.; Salmon, P. (1979). Silagem de milho para potras em crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 8 (3), 365-375.
- Westervelt, R. G.; Stouffer, J. R.; Hintz, H. F.; Schryver, H. F. (1976). Estimating fatness in horse and ponies. *Journal of Animal Science*, 43(4), 781-785

**Appendix 1** – Data of mares used in the assay.

<b>Animal</b>	<b>Age (years)</b>	<b>Height (cm)</b>	<b>Body length (cm)</b>	<b>Neck length (cm)</b>	<b>Wtape, before (kg)</b>	<b>Wtape, after (kg)</b>	<b>Wformula, before (kg)</b>	<b>Wformula, after (kg)</b>	<b>Thoracic circumference, before (cm)</b>	<b>Thoracic circumference, after (cm)</b>
<b>A</b>	4	142	143	60	310	368	288.70	312.09	155	161
<b>B</b>	5	143	140	61	290	305	282.65	286.86	155	156
<b>C</b>	5	145	145	60	325	368	296.53	320.40	156	162
<b>D</b>	7	146	147	60	400	436	374.00	387.75	174	177
<b>E</b>	9	147	146	60	368	390	342.17	355.26	167	170
<b>F</b>	8	150	154	60	413	436	387.32	410.82	173	178
<b>G</b>	9	145	145	59	345	390	311.93	340.48	160	167
<b>H</b>	6	144	142	58	390	413	341.47	345.52	169	170
<b>I</b>	6	150	150	61	430	461	386.78	418.34	175	182
<b>J</b>	9	146	147	56	325	368	320.82	332.89	161	164

<b>Animal</b>	<b>Neck perimeter insertion, before (cm)</b>	<b>Neck perimeter insertion, after (cm)</b>	<b>Neck perimeter medial portion, before (cm)</b>	<b>Neck, perimeter medial portion, after (cm)</b>	<b>Body Condition Score 0-5, before</b>	<b>Body Condition Score 0-5, after</b>	<b>Body Condition Score 1-9, before</b>	<b>Body Condition Score 1-9, after</b>	<b>Crest Neck Score 0-5, before</b>	<b>Crest Neck Score 0-5, after</b>
<b>A</b>	106	108	83	87	1	3	3	6	1	3
<b>B</b>	103	106	75	84	1	2	2	4	1	3
<b>C</b>	106	110	77	85	2	3	4	5	1	3
<b>D</b>	114	113	90	97	4	4	6	7	3	4
<b>E</b>	110	116	86	93	4	4	6	8	3	4
<b>F</b>	119	117	92	95	4	4	6	7	2	4
<b>G</b>	100	104	82	87	3	3	5	5	2	3
<b>H</b>	114	115	89	94	4	4	6	7	3	4
<b>I</b>	114	122	93	99	4	4	6	7	3	4
<b>J</b>	109	110	82	88	3	3	4	5	2	3

# REVISTA PORTUGUESA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias**

Faculdade de Medicina Veterinária, Pólo Universitário do Alto da Ajuda,  
Sala C3.66, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

☎ +351 213 580 221/2

@ spcv.pt@gmail.com

<http://www.spcv.pt/>



**ISSN 0035-0389**