JULIA RIZZO DE MEDEIROS FERREIRA

**Avaliação do uso de fitoterápico como aditivo alimentar sobre
parâmetros digestivos e inflamatórios de equinos alimentados com
dieta de alto nível de amido**

Pirassununga

2020

JULIA RIZZO DE MEDEIROS FERREIRA

Avaliação do uso de fitoterápico como aditivo alimentar sobre
parâmetros digestivos e inflamatórios de equinos alimentados com dieta
de alto nível de amido

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição e Produção
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal (VNP)

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira
Gobesso

Pirassununga

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4025 FMVZ	Ferreira, Julia Rizzo de Medeiros Avaliação do uso de fitoterápico como aditivo alimentar sobre parâmetros digestivos e inflamatórios de equinos alimentados com dieta de alto nível de amido / Julia Rizzo de Medeiros Ferreira. – 2020. 97 f. : il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2021. Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal. Área de concentração: Nutrição e Produção Animal. Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso. 1. <i>Macleaya cordata</i> . 2. Pônei. 3. Carboidrato não estrutural. 4. Inflamação. 5. Digestibilidade. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Leal, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

Certificado da Comissão de Ética

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO USO DE FITOTERÁPICO COMO ADITIVO ALIMENTAR SOBRE PARÂMETROS DIGESTIVOS E INFLAMATÓRIOS DE EQUINOS ALIMENTADOS COM DIETA DE ALTOS NÍVEIS DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS", protocolada sob o CEUA nº 4587200519 (ID 006740), sob a responsabilidade de **Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso e equipe; Julia Rizzo de Medeiros Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 02/07/2019.

We certify that the proposal "EFFECT OF NATURAL FOOD ADDITIVE USE ON DIGESTIVE AND INFLAMMATORY PARAMETERS OF HORSES FED WITH HIGH SOLUBLE CARBOHYDRATE DIET", utilizing 8 Equines (8 males), protocol number CEUA 4587200519 (ID 006740), under the responsibility of **Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso and team; Julia Rizzo de Medeiros Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/02/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2019** a **11/2019**

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 12 anos**

N: **8**

Linhagem: **Mini Horse**

Peso: **130 a 180 kg**

Local do experimento: O experimento será conduzido no Laboratório de Saúde Digestiva e Desempenho de Equinos (LabEqui) pertencente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Campus Administrativo Fernando Costa, em Pirassununga (SP), sob coordenação do Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, e nas baias pertencentes à Prefeitura do Campus Fernando Costa, em Pirassununga (SP).

São Paulo, 31 de agosto de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERREIRA, Julia Rizzo de Medeiros

Título: Avaliação do uso de fitoterápico como aditivo alimentar sobre parâmetros digestivos e inflamatórios de equinos alimentados com dieta de alto nível de amido

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos cavalos, esses seres incríveis que me
inspiram diariamente e são a razão do meu
trabalho, dedico esta obra.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso por, mais uma vez, abrir as portas do Labequi para mim. O senhor teve papel crucial no meu interesse pela nutrição equina na graduação e continua tendo hoje. Muito obrigada pela oportunidade de desenvolver este projeto fantástico e por todos os ensinamentos nos últimos anos.

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação Alisson, André, Ângelo, Camila, Filipe, Henrique, Monique, Paula, Raphaella e Raquel por toda ajuda e amizade construída nesses últimos anos. Vivemos momentos preciosos que serão levados por toda a minha vida. Juntos, fomos e seremos mais fortes!

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica e estagiários do Labequi pelo empenho, ajuda e convivência. Uma das coisas que mais me encanta em poder estar no meio acadêmico é a troca de experiência com vocês.

Agradeço a Lígia Mesquita e Ester Fabricio do Laboratório de Genômica Funcional (LGF) e aos integrantes do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), em especial professor Guilherme Pugliesi, Priscila Ferraz e Gabriela Dalmaso. O auxílio de vocês por meio do fornecimento de materiais e da contribuição intelectual foram fundamentais para a execução deste projeto de mestrado.

Agradeço a todos os brilhantes professores que tive a oportunidade de conviver em aulas ou nos corredores. Vocês são grande fonte de inspiração.

Agradeço aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP), em especial do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), e do setor de equideocultura do campus de Pirassununga.

Agradeço à empresa Phytobiotics por acreditar no potencial do estudo e realizar seu financiamento.

Aos meus queridos pôneis Dunga, Dengoso, Feliz, Zangado, Atchim, Branco, Soneca e Mestre, o meu agradecimento mais sincero por permitirem que trabalhasse com vocês novamente. Vocês são seres especiais e meu carinho por cada um é enorme.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família e amigos. Agradeço à minha família que sempre me permitiu acreditar e realizar meus sonhos e me incentivou a questionar constantemente a realidade à minha volta. Essas foram as principais

contribuições para o surgimento da minha curiosidade e do meu amor pela pesquisa. Vocês são a minha base. Agradeço ao Marcelo Lapolla pela sua generosidade, reforçando constantemente que eu era capaz e competente, e aos meus amigos que estão presentes em todas as etapas da minha vida e fazem do meu mundo um lugar melhor.

“Nunca tenha certeza de nada, porque a sabedoria começa com a dúvida.”

Sigmund Freud

RESUMO

FERREIRA, J. R. M. **Avaliação do uso de fitoterápico como aditivo alimentar sobre parâmetros digestivos e inflamatórios de equinos alimentados com dieta de alto nível de amido**. 2020. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

A utilização de altas quantidades de grãos na dieta dos equinos leva ao consumo excessivo de amido, alterando populações microbianas e produtos fermentativos. Essas alterações podem acarretar no comprometimento da barreira gastrointestinal e ter consequências graves para a saúde equina. Assim, os aditivos alimentares vêm ganhando grande importância para minimizar os efeitos negativos da alta inclusão de amido. Os componentes da planta *Macleaya cordata* vêm sendo utilizados na alimentação animal por possuírem efeitos biológicos múltiplos, entre eles, anti-inflamatório e antibiótico. Sua eficácia e segurança já foram comprovadas em diversas espécies, mas não há relatos de seus efeitos em equinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de níveis crescentes de um fitoterápico comercial à base de *Macleaya cordata* sobre a saúde do trato gastrointestinal e seus reflexos sistêmicos em pôneis submetidos a uma dieta com alto nível de amido. Foram utilizados oito pôneis, raça Mini-Horse, castrados, hígidos, com idade média de $8,59 \pm 0,17$ anos e peso corpóreo (PC) médio de $146,72 \pm 16,53$ kg. O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino duplo 4x4 contemporâneo, sendo a unidade experimental o animal dentro de cada período experimental ($n = 8$ unidades por tratamento). A dieta atendeu exigência nutricional diária para animais em manutenção de 1,75% do PC em matéria seca, em uma proporção concentrado:volumoso de 60:40. A quantidade de amido fornecida diariamente correspondeu a 4,4 g/kg de PC, dividida em duas refeições. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Controle: concentrado sem aditivo, 2) S1: concentrado com adição de 1mg de fitoterápico/kg de PC, 3) S1,5: concentrado com adição de 1,5 mg de fitoterápico/kg de PC, 4) S2: concentrado com adição de 2 mg de fitoterápico/kg de PC. Foram avaliadas as seguintes variáveis: coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes, parâmetros fecais, parâmetros sanguíneos relacionados à segurança alimentar e ao metabolismo energético, parâmetros de estresse oxidativo, espessura

de parede intestinal (inflamação local), parâmetros inflamatórios sistêmicos e comportamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo PROC MIXED do programa Statistical Analysis System, ao nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a adição do fitoterápico teve efeito sobre: CDA de extrato etéreo da dieta, concentração de albumina sérica, concentração de triglicérides em jejum e espessura de parede intestinal. Em relação à digestibilidade aparente de extrato etéreo, o grupo S2 (63,75%) teve digestão 16% maior que o controle (54,55%). O grupo S2 também apresentou menor média de albumina (2,97 g/dl), mas sem prejuízo para a espécie. A concentração de triglicérides foi menor apenas no grupo S1 (29,87 mg/dl) quando comparada ao controle (37,24 mg/dl). Já a espessura de parede intestinal foi menor para todos os grupos tratados (Controle: 3,08 mm; S1: 2,59 mm; S1,5: 2,53 mm; S2: 2,44 mm). Pode-se concluir que a adição de fitoterápico comercial à base de *Macleaya cordata* à dieta de equinos recebendo alto nível de amido é segura e benéfica, pois melhora a digestibilidade, modula a resposta imune local e não tem impactos negativos para a espécie.

Palavras-chave: *Macleaya cordata*. Pônei. Carboidrato não estrutural. Inflamação. Digestibilidade.

ABSTRACT

FERREIRA, J. R. M. **Evaluation of a phytoterapeutic as food additive on digestive and inflammatory parameters of horses fed a high starch diet.** 2020. 97 f.
Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

High amounts of grains in equine diet lead to an excessive starch intake modifying microbial populations and fermentative products. These changes could compromise the gastrointestinal barrier which has serious consequences for equine health. Therefore, feed additives are receiving great attention to minimize negative effects related to high starch level inclusion. *Macleaya cordata* compounds are being used in animal nutrition for their multiple biological effects, including anti-inflammatory and antibiotic properties. Efficacy and security have been proven in many species, however there are no information about effects on horses. The aim of this study was to evaluate effect of increasing levels of a *Macleaya cordata* commercial phytoterapeutic on gastrointestinal tract health and systemic consequences of ponies fed a high starch diet. Eight gelding ponies, Mini-Horse breed, healthy, mean age 8.59 ± 0.17 years old and mean body weight (BW) $146,72 \pm 16,53$ kg were used. Experimental design was contemporary double Latin-square 4x4. Experimental unit was the animal inside each experimental period ($n = 8$ units per treatment). Diet attended daily maintenance nutritional requirement of 1.75% BW in dry matter in a concentrate:roughage proportion of 60:40. Daily starch amount was 4,4 g/kg BW, divided in two meals. Water and mineral salt were provided *ad libitum*. Animals were separated in four groups: 1) Control: concentrate without food additive, 2) S1: concentrate with 1 mg of phytoterapeutic/kg BW, 3) S1,5: concentrate with 1.5 mg of phytoterapeutic/kg BW, 4) S2: concentrate with 2 mg of phytoterapeutic/kg BW. Variables were: nutrient apparent digestibility coefficients (ADC), faecal parameters, blood parameters related to food safety and energetic metabolism, oxidative stress parameters, intestinal wall thickness (local inflammation), systemic inflammatory parameters and behaviour. Data was analysed by Statistical Analysis System program with PROC MIXED. Significant level was 5%. Results showed that phytoterapeutic addition had impact on: diet ether extract ADC, serum albumin, fasting triglycerides and intestinal wall thickness. S2 group had ether extract ADC (63.75%) 16% higher than control (54.55%). Also, S2 group had lower albumin (2.97 g/dl), but

without prejudice to the specie. Triglycerides were lower only in S1 group (29.87 mg/dl) compared to control group (37.24 mg/dl). Intestinal wall was thinner in all treated groups (Control: 3.08 mm; S1: 2.59 mm; S1.5: 2.53 mm; S2: 2.44 mm). In conclusion, *Macleaya cordata* commercial phytoterapic addition in high starch equine diet is safe and beneficial, because it improves digestibility, modulates local immunity and has not negative effects for horses.

Keywords: *Macleaya cordata*. Pony. Non-structural carbohydrate. Inflammation. Digestibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de atividades em cada período experimental (quadrado latino)	45
Figura 2 - Baías adaptadas para o bem-estar de pôneis, permitindo visualização do meio exterior e acesso ao alimento em cochos adaptados	47
Figura 3 - Piquete de terra com manjedoura para fornecimento de feno e cochos de água e sal mineral adaptados para pôneis	48
Figura 4 - Coleta de fezes realizada após primeira defecação espontânea para análise de ácidos graxos de cadeia curta	49
Figura 5 - Mensuração da parede intestinal em três pontos distintos da melhor imagem estática obtida no software MyLabTM Desk3	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes e formulação do concentrado experimental	45
Tabela 2 - Composição bromatológica dos alimentos utilizados durante o período experimental	46
Tabela 3 - Sequências forward (F) e reverse (R) dos primers dos genes alvo e referência analisados por qPCR	56
Tabela 4 - Etograma utilizado para definição do comportamento dos animais	57
Tabela 5 - Peso e escore de condição corporal (ECC) (Médias + Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	58
Tabela 6 - Coeficientes de Digestibilidade Aparente (CDA) (Médias $\pm$ Erro Padrão) dos nutrientes nas fezes de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	58
Tabela 7 - Concentração molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e lactato (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	59
Tabela 8 - Valores de pH fecal (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	59
Tabela 9 - Valores hematológicos e bioquímicos (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	60
Tabela 10 - Glutathiona peroxidase eritrocitária (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	60
Tabela 11 - Colesterol e triglicérides de pôneis (Médias $\pm$ Erro Padrão) recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	61
Tabela 12 - Glicemia basal, insulinemia basal e área abaixo da curva (AAC) de glicose e insulina (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	61

Tabela 13 - Espessura da parede intestinal (Médias $\pm$ Erro Padrão) de cólon dorsal direito de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	63
Tabela 14 - Fibrinogênio (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	63
Tabela 15 - Expressão gênica de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	64
Tabela 16 - Duração, em minutos, da demonstração de comportamentos pré-definidos (Médias $\pm$ Erro Padrão) por pôneis, durante confinamento individual em baias, recebendo dieta com alto nível de amido e suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	65
Tabela 17 - Consumo de água diário (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico da curva glicêmica ($\text{mmol/L} \cdot \text{h}^{-1}$) de pôneis recebendo dietas com altos níveis de carboidratos solúveis e diferentes concentrações de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	62
Gráfico 2 - Gráfico da curva insulinêmica ($\mu\text{UI/mL} \cdot \text{h}^{-1}$) de pôneis recebendo dietas com altos níveis de carboidratos solúveis e diferentes concentrações de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	62
Gráfico 3 - Expressão gênica de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de <i>Macleaya cordata</i>	64
Gráfico 4 - Tempo dedicado (%) para cada comportamento pré-definido por pôneis em confinamento individual, recebendo dieta com altos níveis de carboidratos não estruturais	65
Gráfico 5 - Tempo dedicado (%) para cada comportamento pré-definido por pôneis recebendo dieta com alto nível de amido quando soltos em grupo por 1 hora	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1	ADAPTAÇÕES ANATOMO-FISIOLÓGICAS DOS EQUINOS	23
3.2	A BARREIRA GASTROINTESTINAL E AS CONSEQUÊNCIAS DOS DISTÚRBIOS LOCAIS	27
3.2.1	A BARREIRA GASTROINTESTINAL	27
3.2.2	A INFLUÊNCIA DA DIETA SOBRE A BARREIRA INTESTINAL	30
3.2.3	ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DECORRENTE DE ALTERAÇÕES NO AMBIENTE INTESTINAL E SUAS CONSEQUÊNCIAS	32
3.3	METABOLISMO ENERGÉTICO	33
3.3.1	METABOLISMO DE LIPÍDEOS	33
3.3.2	METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS EM EQUINOS	34
3.3.3	RESISTÊNCIA À INSULINA DECORRENTE DE ALTAS QUANTIDADES DE CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS NA DIETA E SUAS CONSEQUÊNCIAS ...	37
3.3.4	PÔNEIS	38
3.4	<i>MACLEAYA CORDATA</i>	39
3.4.1	COMPONENTES DA PLANTA <i>MACLEAYA CORDATA</i>	39
3.4.2	O USO DA PLANTA <i>MACLEAYA CORDATA</i>	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	LOCAL	43
4.2	ANIMAIS	44
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DIETAS	44

4.4 INSTALAÇÕES	47
4.5 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DOS NUTRIENTES	48
4.6 PARÂMETROS FECAIS	48
4.6.1 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (AGCC) E ÁCIDO LÁTICO	48
4.6.2 PH FECAL.....	50
4.7 SEGURANÇA ALIMENTAR	50
4.7.1 HEMOGRAMA, LEUCOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA.....	50
4.7.2 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	51
4.9 METABOLISMO ENERGÉTICO	51
4.10 INFLAMAÇÃO LOCAL	52
4.11 INFLAMAÇÃO SISTÊMICA.....	53
4.11.1 FIBRINOGENIO	53
4.11.2 CITOCINAS IL-6 E IL-10 E PROTEÍNAS HAPTOGLOBINA E AMILOIDE A SÉRICO.....	53
4.11.2.1 COLETA DE SANGUE E SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC).....	54
4.11.2.2 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA	54
4.11.2.3 REAÇÃO EM CADEIA QUANTITATIVA DE POLIMERASE (PCR)	55
4.12 COMPORTAMENTO E CONSUMO DE ÁGUA.....	56
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5 RESULTADOS.....	58
5.1 PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL.....	58
5.2 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DOS ALIMENTOS.....	58
5.3 PARÂMETROS FECAIS	59
5.4 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA	59
5.5 GLUTATIONA PEROXIDASE ERITROCITÁRIA.....	60
5.6 METABOLISMO ENERGÉTICO	61

5.7 INFLAMAÇÃO LOCAL	63
5.8 INFLAMAÇÃO SISTÊMICA.....	63
5.9. COMPORTAMENTO E CONSUMO DE ÁGUA.....	64
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICES.....	94
APÊNDICE A – PARÂMETROS SANGUÍNEOS DOS PÔNEIS UTILIZADOS ANTES DO INÍCIO DA PRIMEIRA FASE EXPERIMENTAL.....	95
ANEXOS	96
ANEXO A – NÚCLEO EQUINO UTILIZADO NA RAÇÃO	97

1 INTRODUÇÃO

Os equinos são herbívoros monogástricos com câmaras de fermentação no intestino grosso. Em vida selvagem, pastejam durante longas horas por dia, buscando folhas, colmos e brotos com alto teor de água, proteínas solúveis, lipídeos, açúcares e carboidratos estruturais, mas pouco amido (DITTRICH et al., 2010).

Para a digestão e utilização adequada dos componentes da dieta, o trato gastrointestinal do cavalo é colonizado por um vasto e complexo ecossistema com diversas espécies de microrganismos. Esses microrganismos comensais provêm nutrientes, regulam o desenvolvimento epitelial e dificultam a colonização por patógenos ao competirem com eles (STEWART, PRATT-PHILLIPS E GONZALEZ, 2017). Desempenham papel anti-infecção, portanto acabam por ser um dos três principais pilares da barreira gastrointestinal (LACOB & LACOB, 2019).

Os outros dois pilares são o epitélio e a imunidade intestinais (LACOB & LACOB, 2019). O epitélio intestinal apresenta mecanismos de defesa estruturais e funcionais e está em contato direto com a lâmina própria e células imunes (GUIGUÈRE & PRESCOTT, 2000), sendo que estas últimas estão em maior quantidade na lamina própria intercriptal dos equinos (PACKER et al., 2005). A maioria das interações entre os microrganismos promove saúde, mas algumas alterações ambientais podem levar a impactos na homeostase intestinal, doença inflamatória e comprometimento da barreira (MARTIN et al., 2017; LACOB & LACOB, 2019).

Diversos estudos vêm demonstrando que a dieta pode levar a muitos problemas para os equinos ao influenciar populações microbianas, parâmetros de fermentação e inflamação (SHIRAZI-BEECHY, 2008). A grande utilização de grãos nas dietas leva ao consumo de altas quantidades de amido e, quando estas são excessivas, podem exceder a capacidade de digestão do cavalo no intestino delgado. Amido não digerido será fermentado pela microbiota residente no intestino grosso, levando a baixo aproveitamento energético pelo animal e graves consequências para sua saúde (HARRIS & GEOR, 2009).

As alterações em ambiente luminal podem levar à manifestação do potencial patogênico de microrganismos normalmente simbióticos, assim o uso de alimentos concentrados aumenta muito o risco de disbiose (JULLIAND & GRIMM, 2017). Quadros de disbiose podem alterar a permeabilidade intestinal e resultar em

diarreia, cólica, colite, endotoxemia e laminite (STEWART, PRATT-PHILLIPS E GONZALEZ, 2017).

Aditivos alimentares vêm ganhando destaque na alimentação animal por diminuir os efeitos nocivos das dietas utilizadas, além de conseguirem modular a microbiota residente. Os componentes da planta *Macleaya cordata*, um aditivo alimentar fitoterápico, levam a maior ganho de peso e menor conversão alimentar em animais de produção (KHADEM et al., 2014; KANTAS et al., 2015; ESTRADA-ÂNGULO et al., 2016).

Um de seus principais ingredientes ativos é a Sanguinarina (SG), um alcalóide de benzofenantridina que possui efeitos biológicos múltiplos, sendo os principais antibiótico e anti-inflamatório (DVORAK et al., 2006; DVORÁK E SIMÁNEK, 2007). O efeito anti-inflamatório mostrou-se útil em quadros de colite induzida (VRUBLOVA et al., 2010), apresenta efeito protetivo contra processos de isquemia (WANG et al., 2017) e diminui os efeitos do estresse do desmame (CHEN et al., 2020).

O uso de alimentos com altos níveis de carboidratos não estruturais na dieta de cavalos é perigoso e leva a quadros de inflamação, porém, trata-se de uma realidade. A utilização de aditivos alimentares, como extratos de *Macleaya cordata*, poderia favorecer a saúde digestiva desses animais, porém sua eficácia precisa ser comprovada e seus riscos mensurados, já que não existem estudos em equinos e os dados obtidos em outras espécies não devem ser extrapolados. Nível de inclusão seguro e eficaz deste fitoterápico deve ser definido para cavalos, assim como devem ser observados efeitos na digestibilidade dos nutrientes de forma positiva, modulando a microflora benéficamente.

Assim, a hipótese deste trabalho é de que a inclusão de componentes da planta *Macleaya cordata* na dieta de equinos alimentados com alto nível de amido é segura e promove redução da inflamação intestinal e sistêmica, melhorando também a digestibilidade dos nutrientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inclusão de níveis crescentes de um fitoterápico comercial à base de componentes da planta *Macleaya cordata* sobre a saúde do trato gastrointestinal e seus reflexos sistêmicos em equinos submetidos à dieta com alta relação concentrado/volumoso e alto nível de amido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- o Avaliar a digestibilidade aparente total dos nutrientes da dieta;
- o Analisar os ácidos graxos de cadeia curta, o ácido láctico e o pH das fezes;
- o Avaliar os impactos sobre o metabolismo de lipídeos;
- o Avaliar os impactos sobre a resposta pós-prandial;
- o Mensurar a espessura da parede intestinal por exame ultrassonográfico para avaliação da inflamação local;
- o Avaliar parâmetros de inflamação sistêmica por análises sanguíneas e de expressão gênica;
- o Analisar parâmetros sanguíneos relacionados à saúde dos animais e possível toxicidade;
- o Avaliar o comportamento dos animais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ADAPTAÇÕES ANATOMO-FISIOLÓGICAS DOS EQUINOS

Os equinos são classificados como animais monogástricos, de pastejo, com grande capacidade de seleção, preferindo se alimentar de folhas, colmos e brotos. Pastam por 10 a 16 horas por dia, com duração média de 2 a 3 horas por refeição e intervalos curtos entre as mesmas para locomoção, interação social e descanso (DITTRICH et al., 2010).

O cavalo apreende o alimento com os lábios, a língua e os dentes incisivos. Estes sofreram adaptações durante anos de evolução para permitir uma perfeita preensão, ingestão e alteração da forma física do alimento. Os dentes são responsáveis pela diminuição das partículas e essenciais para o aproveitamento do alimento. Em média, o equino realiza de 60 a 80 movimentos mastigatórios por minuto, normalmente, sempre do mesmo lado. A velocidade de ingestão depende do tipo de alimento, sendo que alimentos concentrados requerem menor tempo do que volumosos (BRANDI & FURTADO, 2009).

A saliva é produzida e misturada com o alimento apenas durante a mastigação, sendo que sua produção varia de 40 a 90 ml por minuto. Ela não contém enzimas digestivas, porém possui altas quantidades de minerais e bicarbonato, responsáveis por neutralizar os ácidos formados na porção inicial do estômago. Ajuda ainda a umedecer o alimento, favorecendo o trânsito intestinal e a penetração do suco gástrico no bolo alimentar (BRANDI & FURTADO, 2009).

O esôfago é um longo tubo muscular que passa pela faringe, descendo até o estômago. Os dois terços iniciais possuem musculatura estriada, enquanto que o terço final tem musculatura lisa. A conformação e a angulação da parte distal do esôfago e o desenvolvimento do esfíncter muscular da entrada do estômago, a cardia, não permitem a regurgitação e saída de gás e fluido (AL JASSIM & ANDREWS, 2009).

O estômago do cavalo está localizado do lado esquerdo do abdômen e tem normalmente capacidade de 8 a 16 litros, já que está adaptado a receber pequenas quantidades de alimento, de forma contínua. Suas principais funções são estocar, misturar e quebrar o alimento. Fluidos passam rapidamente por ele, contudo

partículas sólidas podem permanecer até 48 horas (MOORE et al., 2001, BRANDI & FURTADO, 2009).

Quase metade da superfície da mucosa gástrica é recoberta por epitélio aglandular, onde ocorre a fermentação de açúcares, amido e proteínas por microorganismos. O resultado é a produção de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta e pequenas quantidades de gases, sendo o pH normal dessa porção entre 5 e 6 (MOORE et al., 2001, BRANDI & FURTADO, 2009). A microbiota estomacal é composta por uma variedade de bactérias anaeróbias. Os Filos Firmicutes (gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Sarcina*), Proteobacteria (gêneros *Actinobacillus* e *Moraxella*) e Bacteroidetes (gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas*) são os mais abundantes na mucosa gástrica (PERKINS et al., 2012; COSTA et al., 2015).

Nas regiões fúndica e pilórica, o epitélio de revestimento é glandular. Nas porções glandulares é realizada a secreção de ácido clorídrico, pepsina e gastrina. Por conta da secreção de ácido, o pH vai caindo, podendo chegar a 2,6 próximo ao pilóro (MOORE et al., 2001, BRANDI & FURTADO, 2009). Para proteger a mucosa, as glândulas gástricas também têm células secretoras de bicarbonato e muco. Entre as porções aglandular e glandular do estômago há a *margo plicatus* (MERRIT, 1999).

O intestino delgado mede, aproximadamente, de 20 a 25 metros e é compreendido por duodeno, jejuno e íleo. A porção descendente inicial do duodeno se encontra dorsalmente do lado direito do abdômen, elevada pelo mesentério, sofrendo um desvio medial. O jejuno tem, aproximadamente, 20 metros e um longo mesentério, localizando-se na região ventral do abdômen. Ao final do jejuno, a parede intestinal se torna musculosa, o lúmen diminui e inicia-se a porção final do intestino delgado, o íleo. O íleo se junta ao ceco em sua porção dorsomedial (MOORE et al., 2001).

Enzimas pancreáticas e bile são adicionadas à ingesta na porção proximal do duodeno (MOORE et al., 2001). As principais enzimas para a digestão de carboidratos são α -amilase, α -glicosidases, sacarase e dissacaridase (BRANDI & FURTADO, 2009). A α -amilase limita a digestão de amido da dieta em equinos, pois se encontra em baixas concentrações, além de possuir habilidade limitada de

degradação. A α -amilase equina tem capacidade de digestão 20% menor em relação à de bactérias (RICHARDS et al., 2003).

Sucrase, maltase e lactase são enzimas responsáveis pela hidrólise de dissacarídeos. Sucrase e lactase são expressas em maiores quantidades em duodeno e jejuno, enquanto que a maltase é expressa em todas as porções do intestino delgado. O transporte do monossacarídeo glicose, resultante das degradações de carboidratos, é realizado através de uma via dependente de Na^+ . O duodeno é o local com maior taxa de transporte de glicose. A isoforma do cotransportador de Na^+ / glicose com maior afinidade em equinos é o SGLT1 e a mesma está expressa em maiores quantidades justamente no duodeno, caindo distalmente (DYER et al., 2002).

Parte da digestão de proteína da dieta também ocorre no intestino delgado por enzimas. Aproximadamente, 45% da proteína de forragens é digerida nessa porção do trato gastrointestinal (GIBBS et al., 1996), mas depende da concentração de nitrogênio dietético. Concentrações menores de nitrogênio dietético têm uma maior porcentagem de nitrogênio digerido no intestino delgado (FARLEY, 1995). Cereais e seus subprodutos podem apresentar até 80% de sua proteína digerida. Ainda, a digestão de lipídeos é praticamente toda pré-cecal, sendo que sua digestibilidade varia de 90 a 95% (SANTOS et al., 2011).

Em relação à microbiota, ao longo do intestino delgado predominam *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp., gêneros similares ao observado no estômago. A presença dessas bactérias pode estar associada à seleção pelo pH e enzimas digestivas (COSTA et al., 2015). A população total bacteriana é alta, mas menor do que o encontrado no intestino grosso (AL JASSIM & ANDREWS, 2009).

O final do intestino delgado ocorre na junção do íleo ao ceco em sua porção dorsomedial. O ceco é uma enorme câmara de fermentação com fundo cego, de 1,5 a 2 metros, com capacidade aproximada de 30 litros de fluido e ingesta. Localiza-se do lado direito do abdômen, desde a fossa paralombar até a cartilagem xifoide na linha ventromedial. A contração das musculaturas cecais permite a mistura do bolo alimentar com os microrganismos presentes (MOORE et al., 2001). A maioria da ingesta leva uma média de 3 horas após a alimentação para alcançar o ceco (SANTOS et al., 2011) e pode permanecer nele por 1,5 a 5 horas (DOUGAL et al., 2012).

Depois de passar pela digestão cecal, a ingesta segue para o cólon ventral direito, a primeira parte do cólon maior, passando pela abertura ceco-cólica. Essa porção do cólon tem um diâmetro de 25 a 30 cm e possui saculações, as quais conseguem reter fibra por mais tempo, a fim de melhorar a digestão da mesma. O conteúdo alimentar, então, se desloca, passando pela flexura esternal e chegando ao cólon ventral esquerdo (MOORE et al., 2001).

Próximo à região pélvica, o diâmetro do cólon diminui acentuadamente e o mesmo dobra sobre si, recebendo o nome de flexura pélvica e dando início à porção não saculada do cólon, o cólon dorsal esquerdo. Na sequência, a ingesta se move pela flexura diafragmática e cólon dorsal direito, onde o diâmetro fica em torno de 30 a 35 cm. Por fim, ela passa pelo cólon transversal, pequena porção com 10 cm de diâmetro, e chega ao cólon descendente, porção saculada, com 4 a 5 metros e mesmo diâmetro. Até 95% de todo fluido presente no trato gastrointestinal é absorvido nessas porções (ceco, cólon maior e cólon descendente) (MOORE et al., 2001).

A digestão em ceco e cólon é totalmente dependente dos microrganismos residentes nesses compartimentos. A população microbiana fermenta todos os componentes não digeridos no intestino delgado, principalmente, os carboidratos da parede celular das forragens. O resultado é a produção de ácidos graxos de cadeia curta, massa microbiana, metano e calor. Os padrões fermentativos (ácidos graxos de cadeia curta, pH e lactato) podem servir como indicadores da atividade da microbiota e da digestibilidade dos substratos. Os ácidos graxos de cadeia curta produzidos no intestino grosso podem contribuir em 60 a 70% da energia absorvida pelo cavalo. Já as proteínas produzidas nessa porção tem baixa utilização pela espécie (SANTOS et al., 2011).

Os produtos da fermentação variam conforme a porção do intestino grosso. Há um aumento na quantidade total dos ácidos graxos de cadeia curta do ceco para o cólon dorsal direito com posterior queda nas fezes. No ceco, propionato e butirato se encontram em níveis mais elevados, enquanto que, em cólon dorsal direito, há maiores quantidades de acetato. As concentrações de amônia também são maiores em cólon dorsal direito. Os diferentes metabólitos se devem às diferentes populações microbianas e os substratos que chegam em cada porção, sendo que o número total de bactérias é maior no ceco e difere do observado em porções mais distais do intestino grosso (DOUGAL et al., 2012).

Em relação às bactérias, tanto em ceco quanto cólon, há predomínio dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Verrucomicrobia, sendo a proporção de cada um variável de acordo com as características individuais e de criação do equino. Abrigam ainda integrantes do Filo Fibrobacteres e grandes quantidades das famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae. Microorganismos da classe Bacilli correspondem a menos de 2%, sendo que Clostridia representa mais de 85% destes (ERICSSON et al., 2016). Há poucas informações sobre protozoários e fungos, mas o local com maiores quantidades de protozoários é o cólon dorsal direito, enquanto que os fungos se distribuem de forma similar ao longo do intestino grosso (DOUGAL et al., 2012).

3.2 A BARREIRA GASTROINTESTINAL E AS CONSEQUÊNCIAS DOS DISTÚRBIOS LOCAIS

3.2.1 A barreira gastrointestinal

O trato gastrointestinal possui funções essenciais para manter a saúde animal. Ele seleciona os nutrientes que serão absorvidos, íons e outros componentes, além de ser uma barreira contra patógenos e substâncias tóxicas (STEWART et al., 2017). O funcionamento dessa barreira depende de três pilares principais: a flora residente, o epitélio intestinal e a imunidade intestinal (LACOB & LACOB, 2019).

A microbiota residente, composta por microrganismos comensais, auxilia na proteção do hospedeiro ao competir com germes potencialmente patogênicos, estabelecendo resistência de colonização e desempenhando um papel anti-infecção (LACOB & LACOB, 2019). Como anteriormente apresentado, nos equinos, essa microbiota é composta por bactérias, protozoários e fungos, sendo influenciada por fatores genéticos do hospedeiro, nutricionais, ambientais e relacionados à homeostase intestinal (MARTIN et al., 2017). As bactérias acabam ganhando destaque, já que as informações sobre populações fúngicas e protozoárias são limitadas (DOUGAL et al., 2012; MURA et al., 2018). Assim, os principais filos bacterianos na espécie são: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Fibrobacteres e Actinobacteria (JULLIAND et al., 2016).

No filo Firmicutes, o qual é o predominante nos equinos, os gêneros mais relevantes são *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium*, sendo que *Lactobacillus* e *Streptococcus* são os gêneros mais encontrados no trato gastrointestinal dos mesmos. O principal gênero do filo Bacteroidetes é *Prevotella*, enquanto que, no filo Proteobacteria, encontramos *Acinetobacter* e *Pseudomonas* e, no filo Fibrobacteres, podemos destacar *Fibrobacter* (SILVA et al., 2009; MOREAU et al., 2014; TORRE et al., 2019). A composição da população microbiana varia conforme a região do trato gastrointestinal (MORRISON et al., 2018).

Ainda, os ácidos graxos de cadeia curta produzidos pela fermentação microbiana parecem estar envolvidos na proteção epitelial e regulação da resposta inflamatória intestinal em mamíferos. O butirato é a principal fonte de energia das células epiteliais, influenciando na produção de enzimas necessárias para o metabolismo celular. Na falta de energia, elas acabam entrando em autofagia (DONOHOE et al., 2011).

Em humanos, as bactérias também parecem estar envolvidas na síntese de peptídeos com efeito antimicrobiano, chamadas de bacteriocinas, que apresentam grande espectro de atividade. Os gêneros Firmicutes e Bacteroidetes, predominantes no trato gastrointestinal de humanos, produzem a maior quantidade de bacteriocinas. Elas têm baixa atividade antibiótica, permitindo o crescimento de outras bactérias e garantindo, assim, uma maior diversidade. As bacteriocinas participam da defesa permanente do intestino do hospedeiro contra bactérias nocivas (DRISSI et al., 2015).

O epitélio intestinal apresenta mecanismos de defesa estruturais e funcionais. Essa monocamada inclui células epiteliais intestinais unidas por junções apicais cobertas externamente por mucosa e estão em contato direto com a lâmina própria e células imunes (GUIGUÈRE & PRESCOTT, 2000). É na lamina própria intercriptal que estão presentes em maiores quantidades as células do sistema imune (PACKER et al., 2005).

O grupo de células epiteliais intestinais é constituído por enterócitos, células Globet secretoras de muco, células M e células de Paneth. Elas expressam receptores reconhecedores de padrões (PRR), como os Nod-like receptors (NLRs), toll-like receptors (TLRs), entre outros, que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs). Ao serem ativados, esses receptores iniciam as cascatas de transdução de sinal citoplasmático e ativam a via NF-kB,

responsável pela produção de interleucinas pró-inflamatórias e indução da resposta imune inata (LACOB & LACOB, 2019).

As células de Paneth e os neutrófilos de equinos também produzem alfa-defensinas, as quais são peptídeos com atividades antimicrobianas de largo espectro, atuando contra bactérias e fungos. Elas protegem o organismo contra patógenos e regulam a flora intestinal. Os equinos possuem um repertório amplo de alfa-defensinas, demonstrando a importância delas na manutenção da saúde local (BRUHN et al., 2009).

A resposta imune intestinal também pode ser gerada pela via de apresentação de antígenos e ativação de células T. Após terem contato com antígenos, as células apresentadoras de antígenos, principalmente as células dendríticas, migram no interior da lamina própria para os linfonodos mesentéricos. Essas células respondem diretamente às bactérias intraluminais ou indiretamente através de citocinas pró ou anti-inflamatórias produzidas na ativação da resposta imune inata. Pode ocorrer a indução de uma resposta predominantemente Th1, onde haverá produção de citocinas como IL-2 e IFN- γ , ou Th2, na qual há favorecimento da imunidade humoral pela produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (VENDRIG & FINK-GREMMEIS, 2012).

A imunidade intestinal precisa ser eficaz, já que o epitélio gastrointestinal representa uma das maiores superfícies do corpo e precisa estar em equilíbrio com a microbiota residente. Para tanto, os microrganismos comensais presentes no epitélio intestinal precisam ser aceitos imunologicamente, pois seus MAMPs ativam o sistema imune (LACOB & LACOB, 2019).

Contudo, essa ativação pela flora comensal leva a uma tolerância da resposta imune. A ativação de NLR2 por ela, por exemplo, desempenha papel chave na diminuição da atividade da resposta inflamatória e na capacidade das células dendríticas em induzir uma resposta CD4⁺ Th1 (LACOB & LACOB, 2019). A resposta gerada, por sua vez, acaba caracterizada por liberação de citocinas imunossupressoras como IL-10, IL-4 e TGF- β , desenvolvimento de células T reguladoras e expressão de células CD4⁺ Th2 na periferia (BORCHERS et al., 2009).

A indução da tolerância imunológica da mucosa protege o epitélio de respostas imunes inflamatórias deletérias e contribui para a maturação do sistema imune. Fica claro que, qualquer distúrbio nesse equilíbrio, pode levar a poderosas

respostas inflamatórias (LACOB & LACOB, 2019), levando a disfunções nessa barreira com consequente alterações de permeabilidade (STEWART, PRATT-PHILLIPS E GONZALEZ, 2017).

3.2.2 A influência da dieta sobre a barreira intestinal

A influência da dieta sobre populações microbianas, parâmetros de fermentação e inflamação e suas consequências em cavalos vem sendo demonstrada em diversos estudos (SHIRAZI-BEECHY, 2008). O simples fato do animal se alimentar já altera as populações bacterianas transitoriamente (HANSEN et al., 2013). Os alimentos fornecidos, a quantidade de alimento por refeição e a frequência de arraçoamento geram respostas distintas da microbiota, levando a alterações na abundância de certas famílias e gêneros (FERNANDES et al., 2014).

Dietas constituídas exclusivamente de volumoso levam ao favorecimento da atividade microbiana fibrolítica e maiores concentrações de acetato e, em menor escala, de butirato. Mudanças abruptas no tipo de forragem, mas que mantenham similaridade botânica e nutricional, não levam a alterações na microbiota. Contudo, quando ocorre a substituição por concentrado, há um grande aumento nas populações de bactérias amilolíticas, na concentração de lactato e diminuição da diversidade bacteriana (JULLIAND & GRIMM, 2017).

O amido, um carboidrato não estrutural, está presente em grandes quantidades nos grãos. A digestão pré-cecal do mesmo depende de muitos fatores, sendo eles: disponibilidade do amido às enzimas do mamífero, a relação amilose e amilopectina do grão, a natureza do amido desse grão, o efeito do processamento e a taxa de passagem intestinal. Ingestões excessivas de amido pelo cavalo podem exceder sua capacidade de digestão. Qualquer quantidade que não seja digerida irá para o intestino grosso, aonde será fermentada pela microbiota residente e gerará menor quantidade de energia ao animal e maiores consequências (HARRIS & GEOR, 2009).

Daly et al. (2012) demonstraram alterações na microbiota do intestino grosso ao comparar as comunidades bacterianas de cavalos recebendo concentrado rico em açúcar e amido. Foi detectado um aumento significativo e progressivo das populações produtoras de ácido láctico e da família dos clostrídios, além de queda nas populações degradadoras de fibra. Os achados nesse grupo foram similares aos

de animais com obstrução simples de cólon e distensão, demonstrando o risco do uso de concentrados e sua relação com o aparecimento de distúrbios gastrointestinais.

Este risco já havia sido apontado por Willing et al. (2009) que identificaram o aumento no número de membros do complexo *Streptococcus bovis/equinus*, relacionados a essas desordens. A estabilidade da microbiota também é prejudicada pela grande presença de nutrientes provenientes do concentrado (HANSEN et al., 2015).

O uso de grãos aumenta a produção de ácidos graxos de cadeia curta, levando a uma maior proporção de propionato e menor de acetato. Ocorre um pico dos mesmos após 4 horas de alimentação, enquanto que animais que consomem só feno apresentam apenas pequenas flutuações. Amônia e pH cecais também diminuem por conta do concentrado por volta de 3 horas pós-alimentação (HANSEN et al., 2015).

A fonte de amido interfere nas condições ambientais do intestino grosso e na microbiota fecal. Equinos alimentados com 2 g de amido/ kg de peso corpóreo apresentaram menor pH quando a origem do amido era milho, mas quando se tratava de aveia, o pH encontrado foi igual ao de animais consumindo apenas forragem. Aliás, mesmo na quantidade de 1g de amido/ kg de PC, o milho levou a queda de pH fecal, assim como trigo na mesma situação. A alimentação com milho ainda leva à diminuição no número de Lactobacilli e bactérias celulolíticas, e aumento de bactérias cocos gram-positivas. O trigo também impacta negativamente sobre os números de bactérias celulolíticas e, assim como o milho, leva ao predomínio de *Enterococcus faecalis* na atividade amilolítica. A aveia só apresenta impacto sobre as degradadoras de fibra em quantidades que atinja 2g de amido/kg de PC (HARLOW et al., 2016).

A frequência de alimentação também impacta na microbiota cecal sem afetar o pH. Refeições únicas e com maiores quantidades de concentrado influenciam a composição microbiana. A abundância relativa de *Streptococcus* é maior nesses casos. Cavalos recebendo concentrado fracionado em três refeições no dia têm maiores quantidade do filo Bacteroidetes em comparação àqueles que recebem refeição única ou dupla (VENABLE et al., 2017).

Assim, fica evidente que o uso de alimentos concentrados aumenta a ocorrência de disbiose (JULLIAND & GRIMM, 2017). Nas alterações do ambiente

luminal, organismos normalmente simbióticos do trato gastrointestinal podem manifestar seu potencial patogênico, ativando o sistema imune e levando à doença inflamatória. Essa situação pode alterar a permeabilidade intestinal, resultando em diarreia, cólica, colite, endotoxemia e laminite (STEWART, PRATT-PHILLIPS E GONZALEZ, 2017).

3.2.3 Ativação do sistema imune decorrente de alterações no ambiente intestinal e suas consequências

Em humanos, os distúrbios patológicos gerados de diversas formas afetam o balanço de proliferação e sobrevivência das células epiteliais intestinais, levando a alterações na arquitetura epitelial, perda da função da barreira e, em casos severos, transformação maligna dos tecidos e câncer. A doença inflamatória intestinal, por exemplo, pode levar ao desenvolvimento de colite associada a câncer colorretal. Provavelmente, é o resultado de danos oxidativos ao DNA das células epiteliais progenitoras. Nessa doença, a taxa de proliferação e apoptose aumenta, levando a defeitos e translocação de antígenos, o que agrava a resposta imune inflamatória (KOCH & NURAT, 2012).

Em cavalos, as doenças inflamatórias intestinais tem etiologia múltipla, estando relacionadas a respostas imunes anormais a antígenos de bactérias, vírus e alimentos (KALCK, 2009). Elas são descritas como um grupo de desordens gastrointestinais caracterizadas por infiltrado celular de mucosa e submucosa com eosinófilos, plasmócitos, linfócitos, basófilos, macrófagos ou células epitelioides. São classificadas em enterite granulomatosa e enterite linfócito-plasmocítica. Animais afetados podem manifestar perda de peso, letargia, anorexia, febre intermitente, edema ventral, diarreia e dor abdominal (ROTH-WALTER et al., 2017).

Contudo, os efeitos da ativação local do sistema imune geram mais do que alterações intestinais. Doenças, como a atrofia sistêmica múltipla em seres humanos, mostraram uma possível relação com disbiose e comprometimento da integridade da barreira intestinal, além da presença de endotoxinas provenientes do intestino. Os autores sugerem a existência de uma ligação entre anormalidades intestinais e neuroinflamação nos pacientes acometidos. A doença é progressiva e sem cura (ENGEL et al., 2017).

Já em equinos, foi comprovado que o excesso de carboidratos na alimentação pode levar a alterações nas populações bacterianas intestinais e ativação do sistema imune com consequências sistêmicas. Cavalos com laminite induzida por fornecimento de altas quantidades de amido de milho ou oligofrutano apresentaram aumento de populações gram-positivas de *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus spp.* logo após a administração. Todos desenvolveram laminite e passaram a apresentar aumento de bactérias gram-negativas potencialmente patogênicas a partir do desenvolvimento do quadro clínico. Os linfonodos cecais e colônicos desses animais estavam aumentados, com alterações de coloração, hiperplasia linfóide e infiltrados eosinofílicos. Não foi isolado DNA bacteriano nos linfonodos, mas a ativação do sistema imune foi evidente, relacionando o quadro inflamatório local com a resposta inflamatória sistêmica (ONISHI et al., 2012).

Quadros de cólica, sejam eles decorrentes de obstruções simples, estrangulações obstrutivas ou doenças inflamatórias, levam a respostas imunes de extensão variável. Contudo, os quadros gastrointestinais exclusivamente inflamatórios (duodeno-jejunité proximal, tiflocolite e peritonite) são os que possuem liberações de proteínas inflamatórias mais intensas. Nesses casos, a inflamação generalizada é vista como parte da resposta ao crescimento bacteriano, invasão bacteriana ou ambos, causando injúria celular (PIHL et al., 2015).

3.3 METABOLISMO ENERGÉTICO

3.3.1 Metabolismo de lipídeos

Quando os equinos se alimentam, a maioria dos carboidratos não-estruturais, proteínas e gorduras é absorvida no intestino delgado (MCKENZIE, 2011). A gordura da dieta é absorvida e cai na corrente linfática antes de chegar à circulação sanguínea. No sangue, ela é transportada como componente de lipoproteínas, as quais são classificadas conforme sua densidade: quilomicrons, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (STOCKHAM, 1995; GEELEN et al., 2001a).

Já os ácidos graxos de cadeia curta decorrentes da utilização da fibra da dieta são utilizados em outros locais. Propionato é utilizado para a gliconeogênese

no fígado, enquanto que acetato e butirato podem ser utilizados diretamente por alguns tecidos ou transformados em ácidos graxos no tecido adiposo (MCKENZIE, 2011).

Quando o animal está em jejum, diversos mecanismos são ativados a fim de manter a glicemia e o uso de ácidos graxos se torna a principal fonte de energia. Os ácidos graxos do tecido adiposo são liberados e, então, transformados em triglicerídeos pelo fígado. Eles saem do fígado como VLDL e são transportados para os tecidos periféricos. Nesses tecidos, a lipoproteína lipase (LPL) hidrolisa os triglicerídeos e os libera (MCKENZIE, 2011). Durante a ação de LPL, VLDL é transformado em lipoproteína de baixa densidade (LDL). A lipoproteína de alta densidade (HDL), em equinos, corresponde a 60% da massa total de lipoproteínas e possui papel crucial no transporte reverso de colesterol, ou seja, dos tecidos periféricos para o fígado. HDL pode ser transformado para VLDL e LDL (HALLEBEEK & BEYNEN, 2016).

Em cavalos, a principal preocupação é quando ocorrem quadros de dislipidemias (STOCKHAM, 1995). As dislipidemias são doenças metabólicas associadas a altas quantidades de lipídeos circulantes, sendo estes os triglicerídeos. São mais comuns em pôneis e jumentos e recebem nomes diferentes conforme a quantidade de triglicérides circulantes e a presença ou ausência de sintomas. Hipertrigliceridemia está presente quando os triglicérides excedem o limite superior normal para a espécie de 100 mg/dl, mas não há sinais de doença. Hiperlipidemia ocorre quando as concentrações estão entre 100 e 500 mg/dl e hiperlipemia quando passam 500 mg/dl com presença de turbidez na amostra devido à alta gordura, além de infiltração gordurosa em órgãos (MCKENZIE, 2011).

3.3.2 Metabolismo dos carboidratos em equinos

Em equinos, a digestão dos carboidratos pode ser feita por hidrolização ou fermentação. A hidrolização ocorre em açúcares com ligações moleculares α -1,4 por ação enzimática, enquanto que a fermentação é feita naqueles que possuem ligações β -1,4 por bactérias. Os carboidratos hidrolisáveis são hexoses, dissacarídeos, alguns oligossacarídeos e amido e os fermentáveis são as fibras solúveis, alguns oligossacarídeos, amido resistente à ação enzimática, hemicelulose, celulose e lignocelulose (HOFFMAN, 2009).

A hidrolização ocorre principalmente no intestino delgado, iniciada pela ação da α -amilase pancreática que quebra as ligações α -1,4. As ligações α -1,6 são quebradas pela amilopectinase. Os dissacarídeos e oligossacarídeos resultantes são processados por dissacaridases (sucrase, maltase e lactase), levando à liberação de açúcares livres (glicose, galactose e frutose). Por sua vez, a fermentação ocorre, principalmente, no intestino grosso, aonde se encontram o maior número de bactérias. São produzidos acetato, propionato, butirato, lactato e valerato (HOFFMAN, 2009).

Há dois tipos de transportadores de glicose: cotransportador Na^+ /glicose tipo 1 (SGLT1) e transportador específico de glicose (GLUT). SGLT1 transporta D-glicose e D-galactose para dentro da membrana da borda em escova de forma ativa, utilizando a bomba Na^+/K^+ -ATPase. Então, esses açúcares acumulados no enterócitos são transportados por diferença de gradiente para a corrente sanguínea por GLUT (HOFFMAN, 2009).

SGLT1, como previamente abordado, está mais presente em duodeno, seguido por jejuno, e em baixíssimas quantidades em íleo em animais alimentados exclusivamente com forragens (DYER et al., 2002). Contudo, quando há grãos na dieta, as taxas de captação de glicose e de transportadores SGLT1 se mantêm as mesmas em duodeno, mas aumentam muito em jejuno e íleo. Ao longo do tempo, a expressão desses transportadores aumenta ao longo de todo o intestino delgado, sendo estimulada pela presença de monossacarídeos no lúmen, mas não amido. Já GLUT2 está presente apenas na membrana basolateral dos enterócitos e também é mais expresso conforme o aumento na necessidade do transporte de glicose para o sangue que ocorre nas dietas com alto carboidrato. É evidente que há um esforço conjunto a fim de maximizar a captação de glicose. Porém, nessa situação, as atividades das dissacaridases continuam iguais (DYER et al., 2009).

A glicose que chega à corrente sanguínea é regulada pelo hormônio insulina, produzido e secretado pelas células-beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas. As células-beta detectam alterações na disponibilidade de moléculas nutricionais como glicose, aminoácidos, ácidos graxos e corpos cetônicos. A secreção de insulina é estimulada pela glicose, os aminoácidos circulantes, secreção de GLP-1 e GIP pelo intestino após uma refeição e estimulação vagal. Tem como função manter a glicemia em níveis adequados (MEGLASSON & MATSCHINSKY, 1986; ARONOFF et al., 2004). Logo após a alimentação, ocorre a

secreção de insulina em duas fases: na primeira, há liberação rápida de insulina pré-formada e, na segunda, ela é sintetizada e liberada de acordo com a glicemia. Ela se mantém alta por mais tempo apenas se as concentrações de glicose permanecerem altas (ARONOFF et al., 2004).

A insulina atua em crescimento, diferenciação e apoptose celular e regula a homeostase da glicose em muitas frentes, aumentando a captação da mesma primeiramente pelas células musculares e adipócitos. O *clearance* da glicose circulante em ambos os tecidos depende da estimulação da translocação do transportador GLUT4 para a superfície celular pela insulina. O hormônio estimula a síntese de lipídeos em fígado e adipócitos e diminui a liberação de triglicerídeos presentes em músculo e gordura (PESSIN & SALTIEL, 2000). A síntese de proteína é estimulada nos músculos e há direcionamento para o uso de glicose como fonte de energia. Os receptores de insulina estão presentes também em fígado e outras células. No fígado, ocorre a promoção da glicogênese, na qual há a produção de glicogênio, e a diminuição de gliconeogênese e glicogenólise (ARONOFF et al., 2004).

A captação de glicose também pode ser realizada sem a necessidade da presença de insulina. As proteínas GLUT1 estão localizadas na membrana celular de diversas células em estado basal e não precisam da estimulação da insulina para ativação e regulação positiva. A regulação positiva se dá pelos fatores de crescimento, como IGF-1. Tecidos que possuem esse transportador são cérebro, eritrócitos, células endoteliais, queratinócitos, banda coronária e tecido lamelar dos cascos. Esses receptores são pouco expressos na musculatura esquelética de equinos (ASPLIN et al., 2011).

Quando os níveis de glicose no sangue se encontram baixos, o hormônio glucagon entra em ação. Ele é processado a partir do proglucagon nas células-alfa pancreáticas. O principal papel do glucagon é estimular a liberação de glicose hepática pela estimulação de gliconeogênese e glicogenólise e inibição da síntese de glicogênio (JIANG & ZHANG, 2003). Na gliconeogênese, a glicose é sintetizada a partir de aminoácidos e lactato, enquanto que, na glicogenólise, ocorre a quebra do glicogênio. Esses processos ocorrem durante o jejum, sendo que a glicogenólise é iniciada primeiro (ARONOFF et al., 2004).

3.3.3 Resistência à insulina decorrente de altas quantidades de carboidratos não estruturais na dieta e suas consequências

Equinos sedentários e alimentados com dietas com alto teor de carboidratos não estruturais têm maiores respostas glicêmica e insulinêmica (GORDON et al., 2007) e apresentam diminuição da sensibilidade à insulina (HOFFMAN et al., 2003). Essa diminuição acaba sendo compensada pelo aumento na secreção de insulina e os transportadores GLUT4 apresentam aumento nas células musculares (STEWART-HUNT et al., 2010). Maiores valores de insulina basal também são registrados em cavalos adultos saudáveis quando estes são alimentados com uma dieta rica em amido em comparação a uma rica em açúcar. Ambas as dietas causam hiperinsulinemia pós-prandial (JACOB et al., 2018).

Hiperinsulinemia basal resulta de uma estimulação persistente das células-beta do pâncreas e, em humanos, está relacionada a concentrações elevadas de ácidos graxos durante o período interprandial. Ela é decorrente do aumento da secreção de insulina ou do atraso na depuração da insulina circulante, podendo ser a causa ou consequência de um quadro de resistência à insulina. O ponto principal é que a hiperinsulinemia pós-prandial não é desejável na espécie, já que o cavalo passa boa parte do dia se alimentando quando está a pasto (FRANK & TRADOS, 2014).

Em equinos, a hiperinsulinemia está associada à obesidade e altas concentrações de ácidos graxos. Contudo, animais normais podem apresentá-la após a ingestão de açúcares, estimulando hormônios como peptídeo-1 similar a glucagon e peptídeo insulínico dependente de glicose. Eles são secretados pelo intestino delgado em resposta à presença de açúcares, aminoácidos e gorduras e regulados pela enzima dipeptídeo peptidase 4. Os hormônios estimulam as células-beta pancreáticas a secretarem insulina e diminuem o esvaziamento gástrico. A cronicidade dessa condição resulta na regulação negativa dos receptores de insulina e do desencadeamento de sinais (FRANK & TRADOS, 2014).

Pode ainda levar à obesidade pelos efeitos anabólicos da insulina sobre o metabolismo lipídico, contribuindo para o fenótipo “easy keeper”. Hiperinsulinemia, obesidade e resistência à insulina hepática podem representar um ciclo vicioso caso ocorra infiltração de gordura no fígado, a qual diminui a depuração da insulina e

aumenta as concentrações de ácidos graxos que induzem à hiperinsulinemia basal (FRANK & TRADOS, 2014).

A hiperinsulinemia prolongada, mesmo em quadros de euglicemia, pode levar ao desenvolvimento de laminite em animais saudáveis e sem histórico prévio da doença (ASPLIN et al., 2007). Esse mecanismo ainda não está bem explicado, mas uma das teorias é que a resistência à insulina e a hiperinsulinemia levam a distúrbios na função vascular que deixam as lâminas do casco mais sensíveis a danos quando expostas a outros fatores predisponentes, como excesso de carboidrato. Outra teoria é o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório crônico decorrente dessa disfunção insulinêmica (GEOR, 2008).

Cavalos caracterizados como resistentes à insulina mostraram maior ativação de toll-like receptor 4 (TLR-4) e maior expressão de supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS-3), levando ao aumento de citocinas inflamatórias em músculo e tecido adiposo visceral (WALLER et al., 2012). A hiperinsulinemia, a resistência à insulina e a obesidade estão relacionadas à síndrome metabólica equina (GEOR, 2008).

3.3.4 Pôneis

Os pôneis são considerados uma raça primitiva. Possuem excelente conversão alimentar (*easy-keepers*), o que permite que eles mantenham ou ganhem condição corporal quando têm acesso a pasto *ad libitum*. Eles apresentam algumas mudanças em seu metabolismo que conferem essa facilidade na manutenção corporal (DUGDALE et al., 2011).

A resposta glicêmica em pôneis é similar a de equinos de outras raças, contudo a resposta insulinêmica é mais intensa quando comparada a equinos de raça padrão e similar a de cavalos Andaluz (BAMFORD et al., 2014). Têm graus de resistência à insulina maiores quando comparados a cavalos irlandeses de sangue quente (RIJNEN & VAN DER KOLK, 2003) e aos de raça padrão, mas sensibilidade igual em relação aos Andaluz. Junto aos cavalos Morgan, Passo Fino e Quarto-de-milha, os pôneis são mais predispostos à síndrome metabólica equina (BAMFORD et al., 2014).

Consequentemente, eles são mais predispostos ao desenvolvimento de laminite (GEOR, 2008). Existem algumas diferenças de respostas inflamatórias entre

pôneis e cavalos de outras raças. Pôneis apresentam maior produção de espécies reativas de oxigênio pelos leucócitos polimorfonucleares, embora menos quimiotaxia dessas células. Ainda, produzem maior quantidade de citocinas e quimioestimuladores pró-inflamatórios, logo respondem de forma mais intensa à inflamação (WILMINK et al., 2003).

3.4 MACLEAYA CORDATA

O gênero *Macleaya* (*Papaveraceae*) tem duas espécies, *Macleaya cordata* e *Macleaya microcarpa*. Essas espécies são perenes e distribuídas por China, América do Norte e Europa, sendo muito utilizadas na medicina oriental chinesa. Recentemente, ela foi reconhecida pelo European Food Safety Authority como um aditivo alimentar para produção animal (LIN et al., 2018).

3.4.1 Componentes da planta *Macleaya cordata*

Sanguinarina (SG) é um alcalóide de benzofenantridina presente em plantas das famílias *Papaveraceae*, *Fumariaceae* e *Rutaceae*. Essa substância possui efeitos biológicos múltiplos, sendo os principais antibiótico e anti-inflamatório. Seu efeito biológico estaria associado ao equilíbrio entre seu cátion quaternário e formas alcanolaminas, o que leva a possibilidade de reação da SG com porções nucleofílicas e aniônicas de aminoácidos em biomacromoléculas. Também já foi relatado formação de complexos moleculares de SG com DNA por intercalação (DVORÁK E SIMÁNEK, 2007).

A farmacocinética da SG ainda é pouco conhecida. A absorção de SG e dihidroderivado de sanguinarina (DHSG) é rápida e ocorre no estômago e intestino (VRUBLOVA et al., 2008), contudo esta é muito pequena, sendo que a maioria é excretada nas fezes, assim sua ação seria mais local (PSOTOVA et al., 2006; GALADARI et al., 2017). Dvorák e Simánek (2007) relatam que SG foi encontrada ligada à albumina na circulação, sendo observada no leite de coelhos, gatos, ratos e macacos.

A metabolização é realizada pelo fígado. Foi demonstrado que a carbonil redutase e/ou quinona-oxidoredutases poderiam estar envolvidas na redução da SG

(GALADARI et al., 2017). Ela é convertida em DHSB para desintoxicação em ratos através da ação dos Receptores de Aril Hidrocarbono (AhR) ativados, que também formam conjugados dos metabólitos reativos (DVORÁK E SIMÁNEK, 2007).

A excreção é bem rápida, sendo que em até 24 horas, não há mais detecção de SG ou DHSB (VRUBLOVA et al., 2008; GALADARI et al., 2017). Ambas foram encontradas em bile (DVORÁK E SIMÁNEK, 2007) e fezes de ratos (VRUBLOVA et al., 2008). Nenhuma foi detectada em urina de ratos (DVORÁK E SIMÁNEK, 2007; VRUBLOVA et al., 2008).

3.4.2 O uso da planta *Macleaya cordata*

Os aditivos alimentares têm ganhado grande interesse por se tratarem de uma alternativa ao uso de antibióticos como promotores de crescimento na produção animal. Sangrovit® é um aditivo alimentar da Phytobiotics Feed Additives® que promove a melhora da absorção alimentar e estimula a digestão de forma natural. Ele contém uma mistura de galhos, folhas, cápsulas e sementes de *Macleaya cordata*, sendo um de seus principais ingredientes ativos a Sanguinarina (SG). Apresenta ainda outros compostos, como o dihidroderivado de SG (DHSB), chelitrina (CH), protopina (PR), alocriptopina (AL) e ácidos fenólicos (DVORAK et al., 2006; KOSINA et al., 2010).

Vrublova et al. (2008) encontrou maior ganho de peso em ratos machos quando suplementados oralmente com alta dose de DHSB de 58mg/kg/dia em comparação ao grupo controle. Em ovelhas recebendo dieta de alta energia para terminação em ambiente de alto calor, a suplementação com 5g por dia de Sangrovit® levou a maior eficiência no ganho de peso (ESTRADA-ÂNGULO et al., 2016).

Frangos de corte suplementados com diferentes doses de Sangrovit® solúvel em água (25, 50 e 100mg/l) tiveram maior peso e maior relação ganho de peso:alimento quando comparados ao grupo controle. A porcentagem de gordura abdominal nos grupos suplementados também foi menor e estaria ligada ao poder anti-inflamatório dos substratos de *Macleaya cordata*, já que em outros estudos em que foram usados corticoides nos animais, houve grande aumento da mesma (KHADEM et al., 2014).

Leitões suplementados com 15 e 50 ppm de Sangrovit® logo após o desmame obtiveram maior peso, maior ganho médio diário de peso e menor taxa de conversão alimentar. A suplementação ainda mostrou uma relação dose-dependente, sendo os melhores resultados obtidos nos animais com dose de 50 ppm. Haptoglobina e amilóide sérico A (SAA) foram utilizados como parâmetros para avaliação de resposta inflamatória decorrente do estresse ao desmame e também se mostraram menores nos animais que receberam o aditivo alimentar (KANTAS et al., 2015).

Cães saudáveis recebendo de 10 a 20 mg/kg de Sangrovit® toleraram bem a adição do fitoterápico à dieta e apresentaram apenas alterações nos ácidos graxos de cadeia curta presentes nas fezes. Este último resultado indica que os alcaloides de isoquinolina presentes em *Macleaya cordata* têm impacto sobre o metabolismo da microbiota intestinal (FAEHNRIK et al., 2019).

O potencial anti-inflamatório de SG foi testado e confirmado. Na indução de colite em ratos com DSS, animais do grupo suplementado com 500ppm ou 9mg/kg de peso corpóreo de Sangrovit® apresentaram lesões mais focais e em menor quantidade no cólon e reto. O efeito protetivo observado nos ratos foi associado ao contato direto do produto com a mucosa. Além disso, apresentaram queda na atividade de mieloperoxidase (MPO), nos níveis de proteína ciclooxygenase-2 (COX-2) e nos níveis de glutathiona reduzida nos eritrócitos (VRUBLOVA et al., 2010).

A glutathiona reduzida em eritrócitos tem um papel importante ao proteger as células contra estresse oxidativo e agentes tóxicos. É um substrato para glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferase. Sua síntese ocorre nos eritrócitos e sua meia-vida pode variar de 2 a 15 dias. A longevidade é diretamente relacionada à glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase e superóxido desmutase presentes no meio intracelular, assim depende da eficiência antioxidativa do sistema e da formação de radicais livres (KURATA, SUZUKI E AGAR, 1993).

Em outro experimento, ratos receberam injeções intraperitoneais com subsequente desafio por substâncias pró-inflamatórias. O tratamento com 1 ou 5mg/kg i.p. de SG apresentou inibição dose-dependente significativa da formação de edema em ratos com inflamação induzida por xileno em orelha, formaldeído em articulação e carragenina em pata. O valor de TNF- α dosado em soro, TNF- α liberado por macrófagos peritoneais e a produção de óxido nítrico pelos mesmos macrófagos ativados *in vitro* também foram significativamente mais baixos nos

grupos tratados com SG, apresentando um padrão dose-dependente (NIU et al., 2012).

Estudo com ratos submetidos à isquemia cerebral transiente demonstrou que o pré-tratamento com SG não só preveniu a morte neuronal posterior, como ainda teve ação neuroprotetora ao diminuir o volume infartado. Estas ações estariam relacionadas à inibição de interleucinas, as quais podem levar a um agravamento do dano cerebral por conta da inflamação. A dose utilizada foi de 15mg/kg administrados intragástrico (WANG et al., 2017).

O uso de *Macleaya cordata in vitro* mostrou diminuição da inflamação de células intestinais de leitões desafiadas com cepas de *E. coli*, sendo uma enterotoxigênica fimbria F4 e outra sem fimbrias para controle. Houve diminuição de IL-1 β , IL-8 e TNF- α , mas não houve melhora dos níveis de IL-10 (SOLER et al., 2016). SG mostrou-se um potente inibidor do fator nuclear kappa B (NF- κ B), o qual é um fator de transcrição pró-inflamatório, envolvido na tumorigênese. Sua ação ocorre pela inibição da fosforilação e degradação de I κ B α , uma subunidade inibidora de NF- κ B. SG também previne a ativação de NF- κ B induzida por TNF α ao não permitir a ligação aos seus receptores (GALADARI et al., 2017).

A suplementação com extrato de *Macleaya cordata* em ovelha no período de desmame teve efeito positivo sobre o estresse oxidativo em intestino delgado. Malondialdeído, um metabólito de peróxido lipídico e indicador de dano oxidativo, foi menor no grupo tratado. A enzima superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, responsáveis por inativar peróxidos, tiveram suas atividades aumentadas. Seu efeito foi similar ao encontrado com o uso de um aditivo probiótico à base de *Lactobacillus plantarum* (CHEN et al., 2020).

Galadari et al. (2017) cita que a SG, além de possuir propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, é um reconhecido agente anti-hipertensivo e com propriedades anti-cancerígenas. Vários estudos têm sido realizados com seu uso no tratamento de cânceres. A SG se mostra eficiente por causar apoptose, autofagia, morte celular bimodal, paralisia do ciclo celular, inibição da invasão do tecido pelas células tumorais e formação de metástases, e quimiosensibilização.

Alguns estudos apontam a ocorrência de citotoxicidade causada pela SG. Hidropsia epidêmica foi relacionada à presença de SG e DHSG no óleo de argemone consumido por pacientes intoxicados. Porém, muitos autores acreditam

que outros compostos presentes no óleo poderiam ter potencializado o efeito tóxico (GALADARI et al., 2017).

Estudos realizados com baixas a moderadas doses de sanguiritrina (SG misturado a CH), SG e DHSG não demonstraram mudanças histológicas em tecidos (GALADARI et al., 2017). Foi encontrado acúmulo de DSGH em tecidos de ratos suplementados com doses de 58mg/kg/dia por mais de 3 meses, principalmente nos órgãos envolvidos na passagem da dieta, como língua e íleo. Contudo, não foram observadas alterações histopatológicas em nenhum tecido analisado, nem genotoxicidade de linfócitos e fígado (VRUBLOVA et al., 2008).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a SG inibe a atividade catalítica das enzimas citocromo P-450 (CYP), a fim de evitar a formação de compostos reativos, os quais seriam citotóxicos (DVORÁK E SIMÁNEK, 2007). Porém, Vrublova et al. (2008) demonstrou que não há efeitos da DHSG sobre a expressão da proteína AhR-dependente de CYP1A1/2 no fígado de ratos.

O uso em produtos orais e dentais de SG parece estar associado ao aumento da prevalência de leucoplaquia do vestíbulo maxilar. Foi observada também citotoxicidade dose-dependente em hepatócitos de humanos e suínos quando usadas doses muito altas de SG (25–100µM) (GALADARI et al., 2017).

Não há relatos do uso de componentes de *Macleaya cordata* em equinos. O potencial anti-inflamatório e antimicrobiano do produto poderia ser extremamente interessante a esta espécie utilizada para esportes de alto desempenho e que possui um manejo alimentar em confinamento tão distinto do natural.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Saúde Digestiva e Desempenho de Equinos (LabEqui) pertencente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, no Campus Administrativo Fernando Costa da Universidade de São Paulo, em Pirassununga (SP), sob coordenação do Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados oito pôneis, machos, hípidos, castrados, da raça Mini Horse, com idade média $8,59 \pm 0,17$ anos, peso corporal médio $150,47 \pm 16,38$ kg, escore de condição corporal (ECC) médio $6,78 \pm 0,89$ (1 a 9) (HENNEKE et al., 1983) e altura média de cernelha $0,95 \pm 0,04$ m. O animal foi considerado hívido ao apresentar exames clínico e laboratorial (hemograma, leucograma, função renal e hepática) dentro da normalidade fisiológica padrão da espécie. Todos os animais foram vermifugados e imunizados contra raiva, influenza, tétano e encefalomielite.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DIETAS

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino duplo 4×4 contemporâneo, sendo a unidade experimental o animal dentro de cada período experimental ($n = 8$ unidades experimentais por tratamento). A distribuição dos animais por tratamento foi aleatória e havia dois animais por tratamento em cada período experimental. O experimento ocorreu em quatro períodos com duração de 20 dias cada, sendo 15 dias para adaptação à dieta e ao local, e cinco dias de coleta total de fezes (CTF). A cada período, foi realizado intervalo de 15 dias (washout) com objetivo de minimizar os eventuais efeitos residuais (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma de atividades em cada período experimental (quadrado latino).

Fonte: FERREIRA, 2020.

A dieta foi formulada segundo as exigências da categoria recomendada pelo INRA (2011). A exigência nutricional diária para animais em manutenção considerada foi de 1,75% do peso corpóreo (PC) em matéria seca, sendo 1,05% de concentrado e 0,7% proveniente de volumoso, caracterizando uma proporção concentrado/volumoso de 60:40. O concentrado foi fornecido na forma de ração farelada à base de amido, enquanto que o volumoso utilizado foi feno de *Cynodon dactylon* cv. *Tifton-85*. Os ingredientes utilizados e a composição bromatológica dos alimentos estão presentes nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Ingredientes e formulação do concentrado experimental

Ingredientes	Porcentagem (%)
Farelo de Trigo	43
Fuba de Milho	46,5
Farelo de Soja	4
Calcário	2,5
Núcleo equino*	3
Sal comum	1
Total	100

*Composição do núcleo equino no ANEXO A.

Fonte: FERREIRA, 2020.

Tabela 2. Composição bromatológica dos alimentos utilizados durante o período experimental.

Nutrientes (%)	Feno	Ração
Matéria Seca	90,64	89,05
Matéria Mineral	7,48	8,57
Proteína Bruta	11,54	15,98
Extrato etéreo	1,70	5,17
FDA	43,73	9,58
FDN	76,20	23,81
Amido	2,00	42,85
Fósforo	0,29	0,78
Cálcio	0,52	1,52

Fonte: FERREIRA, 2020.

Foi adicionado Sangrovit® (Phytobiotics, Eltville, Alemanha), um fitoterápico comercial que contém uma mistura de galhos, folhas, cápsulas e sementes de *Macleaya cordata* sobre a ração no sistema *top dressing*. Ele foi previamente misturado a uma quantidade pré-determinada da ração a fim de aumentar o volume a ser pesado individualmente em balança de precisão. A proporção da pré-mistura foi de 10 mg do produto comercial a cada 1 kg de ração farelada.

Foram utilizadas quatro dietas experimentais:

- 1) Controle: concentrado sem aditivo;
- 2) S1: concentrado com adição de 1 mg de Sangrovit® por kg de peso corpóreo (96 ppm);
- 3) S1,5: concentrado com adição de 1,5 mg de Sangrovit® por kg de peso corpóreo (145 ppm);
- 4) S2: concentrado com adição de 2 mg de Sangrovit® por kg de peso corpóreo (194 ppm).

Visando evitar distúrbios gastrointestinais, os equinos passaram por um período de adaptação à quantidade de concentrado nos primeiros cinco dias da fase experimental, recebendo inicialmente uma proporção de 30:70 de concentrado:volumoso por dois dias e uma proporção de 50:50 de concentrado:volumoso do terceiro ao quinto dia. No sexto dia da fase experimental, os animais já comeram a proporção concentrado:volumoso previamente estipulada de 60:40.

O volumoso e o concentrado foram pesados diariamente em balança digital (Toledo®, modelo: M2098/61, d = e = 0,01 kg), e fornecidos duas vezes ao dia, às 07h00min e às 16h00min. As sobras foram contabilizadas em todas as fases para

avaliação da ingestão da dieta. No washout, os animais foram soltos em piquetes e alimentados apenas com feno *Cynodon ssp. cv. Coast-Cross* (2% do PC em matéria seca), água e sal mineral *ad libitum*.

4.4 INSTALAÇÕES

Durante o período de adaptação (15 dias), os animais ficaram alojados em baias individuais, com piso de concreto forrado com maravalha (Figura 2). Foram utilizados cochos adaptados à altura dos animais para o fornecimento de água, ração e sal mineral. O feno foi fornecido em bacias de plástico. No período de coleta total de fezes (5 dias), a maravalha foi removida e, para evitar a contaminação das amostras, a urina era imediatamente retirada e as baias eram varridas para retirada de feno, pelos e crina.

Figura 2. Baias adaptadas para o bem-estar de pôneis, permitindo visualização do meio exterior e acesso ao alimento em cochos adaptados.

Fonte: FERREIRA, 2020.

No intervalo de 15 dias entre as fases (washout) para evitar resíduos, os animais foram mantidos em piquetes coletivos com acesso a feno, sal mineral e água (Figura 3).

Figura 3. Piquete de terra com manjedoura para fornecimento de feno e cochos de água e sal mineral adaptados para pôneis.

Fonte: FERREIRA, 2020.

4.5 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DOS NUTRIENTES

A análise de alimentos foi feita a partir de amostras do concentrado e do feno coletados no início do experimento. A avaliação da digestibilidade aparente total dos nutrientes foi realizada por metodologia de coleta total de fezes (CTF). Durante o período de colheitas, a cada 12 horas, o total das fezes foi recolhido, pesado, homogeneizado e uma alíquota de 10% (amostras simples) foi alocada em sacos plásticos identificados e armazenados em freezer -20°C que, ao final dos 5 dias de CTF, formaram as amostras compostas.

Foram avaliados nos alimentos e nas fezes os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), fósforo (P) e cálcio (Ca) de acordo com AOAC (2000). Fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram mensuradas pelo método de partição de fibras proposto por Van Soest et al. (1991). A análise do amido dos alimentos foi conduzida segundo o método enzimático descrito por Pereira & Rossi Junior (1995).

4.6 PARÂMETROS FECAIS

4.6.1 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido láctico

Para análise de ácidos graxos de cadeia curta, foram coletados 10 g de fezes imediatamente após a primeira defecação do dia e acondicionados em recipiente de plástico com tampa no terceiro dia da CTF (Figura 4). As amostras foram diluídas em 20 ml de água destilada e, após homogeneização, o material foi coado em tecido poroso. Do conteúdo coado, 4 ml de amostra foram transferidos para tubo Vacutainer BD sem anticoagulante, contendo previamente 1 ml de ácido fórmico PA grau HPLC 98-100%. Os tubos foram centrifugados por 12 minutos a 4000 rpm e 2 ml do sobrenadante foram transferidos para microtubo e congelados a -20°C para análise posterior. A avaliação foi feita através da técnica de cromatografia gasosa Agilent 7890A equipada com um detector de ionização da chama (7683B) e uma coluna capilar fundida em sílica (J&W19091F-112, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (FERREIRA et al., 2016).

Figura 4. Coleta de fezes realizada após primeira defecação espontânea para análise de ácidos graxos de cadeia curta.

Fonte: FERREIRA, 2020.

Para a avaliação de ácido láctico, foi coletado 1 g de fezes imediatamente após a primeira defecação do dia em tubos de vidro de 10 ml com tampa, previamente pesados. Os tubos foram imediatamente congelados a -20°C . O método utilizado para a determinação do ácido láctico foi o espectrofotométrico para fluidos biológicos (PRYCE, 1969).

4.6.2 pH fecal

O pH das fezes foi aferido no quinto dia da CTF como forma de observar possíveis alterações gastrointestinais geradas pela chegada excessiva de carboidratos não estruturais no intestino grosso. As amostras de fezes para mensuração do pH foram coletadas no primeiro momento do dia de defecação espontânea (ZEYNER et al., 2004; GOACHET et al., 2014), diluídas na proporção 1:1, ou seja, 20g de fezes para 20 ml de água destilada, e homogeneizadas. Em seguida, foram coadas. Na sequência, foi imerso o eletrodo do pHmetro no líquido coado para leitura do pH (JOUANY, 1982).

4.7 SEGURANÇA ALIMENTAR

As colheitas de sangue para realização das avaliações laboratoriais foram realizadas através de punção da veia jugular. Foram realizadas colheitas de sangue no dia anterior ao início de cada período de adaptação para avaliação da higidez dos animais. As outras colheitas foram todas realizadas durante a CTF.

4.7.1 Hemograma, leucograma e bioquímica sérica

As amostras de sangue para realização de hemograma e leucograma foram coletadas no quarto dia da CTF, às 9h, e acondicionadas em tubos com EDTA. Todas as amostras para bioquímica sérica também foram coletadas no mesmo dia e horário e acondicionadas em tubos sem anticoagulante. As análises de bioquímica sérica foram realizadas em equipamento automatizado Mindray BS 120 (China), com uso de kits comerciais Labtest (Brasil), dosando-se: Aspartato Aminotransferase (AST); Gama Glutamil Transferase (GGT); Uréia; Creatinina; Proteínas Totais; Albumina; Bilirrubinas totais; Bilirrubina Direta.

As globulinas foram obtidas através de cálculo matemático (proteínas total = albumina + globulinas), assim como, a bilirrubina indireta (bilirrubina total = bilirrubina direta + bilirrubina indireta). As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Ensino, Pesquisa e Extensão em Análises Clínicas Veterinárias (ZMV) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP.

4.7.2 Parâmetros de estresse oxidativo

Para avaliação de citotoxicidade, foi utilizada glutationala peroxidase eritrocitária. As coletas de sangue ocorreram no quarto dia da CTF, às 9h, e foram acondicionadas em tubo com EDTA. As amostras de sangue total foram enviadas para o laboratório DAC Diagnósticos Análises Clínicas e analisadas por espectrofotometria (CALAMARI et al. 2009).

4.9 METABOLISMO ENERGÉTICO

Na avaliação do metabolismo, foram mensurados triglicérides, colesterol, glicose e insulina. As amostras foram obtidas no segundo dia da CTF. Para a análise do colesterol e triglicérides, as amostras de sangue foram coletadas 30 minutos antes da primeira refeição, às 6h30, de acordo com Marchello et al. (2000).

Para mensuração da glicemia e insulinemia, foram realizadas 5 coletas, sendo a primeira antes da alimentação da manhã. Os horários de coleta foram 6h30, 7h30, 8h30, 9h30 e 10h30. O sangue para análise de glicose plasmática foi colhido em tubos Vacutainer BD® com Fluoreto de sódio (tampa cinza) com papel de inibidor glicolítico e o anticoagulante EDTA que atua na preservação da morfologia celular. Para a análise de insulina sérica, o sangue foi colhido em tubos Vacutainer BD® sem anticoagulantes (tampa vermelha).

Os tubos de glicose e insulina foram mantidos em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos e, na sequência, centrifugados por 10 minutos (centrífuga modelo 80-2B-15ML, Centribio) a 1.800 x g para a separação de plasma e soro, respectivamente (STULL; RODIEK, 1988; DE OLIVEIRA RAMALHO et al., 2012). Após esse procedimento plasma e soro foram transferidos para microtubos de plástico de 2 mL devidamente identificados e mantidos em freezers a -20°C até serem processados (STULL; RODIEK, 1988).

As análises de colesterol, triglicérides e glicose foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Ensino, Pesquisa e Extensão em Análises Clínicas Veterinárias (ZMV). Colesterol e triglicérides foram avaliados pelo método colorimétrico – enzimático de Trinder, enquanto que glicose pelo método GOD-Trinder com kits comerciais Labtest (Glicose Ref. 133-1; Calibra H Ref. 80-1;

Qualitrol 1H Ref. 71-1). A análise de insulina foi realizada no laboratório DAC Diagnósticos Análises Clínicas (Pirassununga/SP) pelo método de quimioluminescência (CARSLAKE et al., 2017).

4.10 INFLAMAÇÃO LOCAL

No quinto dia da CTF, foi realizado exame ultrassonográfico transabdominal para determinar a espessura da parede intestinal. Os animais tiveram os pelos raspados na lateral direita a partir do oitavo espaço intercostal até o flanco direito na última semana de adaptação. O exame foi iniciado às 9h30 com aparelho Esaote MyLab^{TM}Delta e probe microconvexa. Foi iniciada a varredura do abdômen a partir do nono espaço intercostal do lado direito para realizar as medidas de cólon dorsal direito (SIWINSKA et al., 2017).

Os vídeos foram salvos no aparelho e os arquivos de multimídia e nativo foram transferidos para dispositivo móvel. Foi utilizado o software MyLab^{TM} Desk3 para avaliação das imagens e mensuração da parede intestinal. A mensuração foi realizada a partir da serosa até a mucosa da melhor imagem estática obtida, em três pontos distintos (Figura 5). Foi feita uma média a partir dos três pontos medidos.

Figura 5. Mensuração da parede intestinal em três pontos distintos da melhor imagem estática obtida no software MyLabTM Desk3.

Fonte: FERREIRA, 2020.

4.11 INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

4.11.1 Fibrinogênio

Foram utilizados tubos com EDTA para a análise de fibrinogênio e a coleta foi realizada no quarto dia da CTF, às 9h. A dosagem da concentração de fibrinogênio foi realizada pela técnica de precipitação pelo calor a 56°C, por 3 minutos, e leitura da proteína por refratometria (JAIN, 1993). A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Ensino, Pesquisa e Extensão em Análises Clínicas Veterinárias (ZMV).

4.11.2 Citocinas IL-6 e IL-10 e proteínas haptoglobina e amiloide A sérico

4.11.2.1 Coleta de sangue e separação das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Os animais tiveram os pelos da região da jugular raspados na última semana de adaptação à dieta. Foram coletados 5 tubos de 5 ml com EDTA no quarto dia da CTF, às 9h, após assepsia local com álcool iodado, utilizando-se luvas sem talco. O material foi levado para o Laboratório de Genômica Funcional (LGF) da Universidade de São Paulo (Pirassununga-SP) para processamento. Os tubos foram centrifugados em temperatura ambiente por 15 minutos a 2000 x g. Foi coletado o buffer coat dos tubos, os quais foram transferidos para microtubos.

Então, foi adicionada uma solução de lise de hemácias aos conteúdos, que foram homogeneizados, e aguardou-se um período de 3 minutos. Os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500 x g, sob refrigeração. O procedimento de lise foi repetido até os pellets ficarem brancos. Após esse procedimento, os tubos foram vertidos e deixados de ponta cabeça em papel toalha sobre a bancada por 10 minutos. Adicionou-se 750µl de Trizol® (Life Technologies, Califórnia, USA) às amostras, as quais foram homogeneizadas e congeladas em ultrafreezer a -80°C para posterior análise.

4.11.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizada conforme as instruções do fabricante no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular da Universidade de São Paulo (Pirassununga-SP). Cada amostra contendo 750µl de Trizol® (Life Technologies, Califórnia, USA) foi homogeneizada em misturador vortex por 5 minutos. O criotubo foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos antes da adição de clorofórmio. Depois, as amostras foram novamente homogeneizadas por 15 segundos e mantidas por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram, então, centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de poliestireno para PCR de 2ml. Foi adicionado álcool isopropanol, seguido por 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.

As amostras foram centrifugadas a 15000 x g por 8 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Em seguida, etanol 75% foi adicionado

ao tubo, o qual foi centrifugado a 15000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e a secagem do pellet foi feita em temperatura ambiente por 5 minutos. Por fim, água de nuclease livre foi adicionada, com homogeneização das amostras de 2 a 3 vezes durante esta etapa, e incubação a 55 °C por 15 minutos.

A concentração e a pureza (A260/A280) do total de RNA extraído foram mensuradas usando espectrofotômetro (NanoVue, GE Healthcare, Chicago, USA). O RNA isolado de todos os pôneis nas diferentes fases foi submetido à transcrição reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Life Technologies) conforme as instruções do fabricante. O cDNA de cada amostra foi mantido a -20°C até a análise de PCR.

4.11.2.3 Reação em cadeia quantitativa de polimerase (PCR)

Para PCR, foram utilizadas as instalações do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular da Universidade de São Paulo (Pirassununga-SP). A análise em tempo real de qPCR foi realizada usando Evagreen (Solis Biodyne) para IL-6, haptoglobina (HAP) e amiloide sérico A (SAA), e SYBR Green (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para IL-10. As reações foram rodadas em triplicatas, usando as mesmas configurações para qPCR descritas previamente (SPONCHIADO et al., 2017) e um aparelho Step One Plus (Life Technologies).

Genes relacionados a processos inflamatórios foram selecionados (IL-6, IL-10, HAP, SAA). Os primers selecionados e testados foram descritos previamente (CHRISTOFFERSEN et al., 2012; HOLBROOK et al., 2012; STARZONEK et al., 2019), mas apenas IL-6 e IL-10 tiveram seus primers validados para as amostras de PBMC de equinos e puderam ser usados no presente estudo. Os genes 18S, GAPDH e ACTB também foram testados como genes de referência, sendo que aqueles que tiveram menor variação pelo software NormFinder foram utilizados (18S e GAPDH) (Tabela 3).

Tabela 3. Sequências forward (F) e reverse (R) dos primers dos genes alvo e referência analisados por qPCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer
IL-6	TGGCTAAGCTGCATTACAGA	GGAAATCCTCAAGGCTTCGAA
IL-10	GATCTCCCAAATCCCATCCA	AGGAGAGAGGTACCACAGGGTTT
GAPDH	GCCATCAATGACCCCTTCAT	TGCCGTGGGTGGAATCA
18S	AACGACACTCTGGCATGCTAACTA	CGCCACTTGTCCCTCTAAGAA

Fonte: FERREIRA, 2020.

As reações foram rodadas em triplicatas em uma placa com 96 poços. Os dados de emissão de fluorescência foram extraídos com o aparelho Step One Plus e analisados pelo software LinReg PCR para padronização, determinação da eficiência do qPCR e dos valores de quantificação por ciclo por amostra, como descrito por Ruijter et al. (2009). A expressão dos genes alvo avaliados por qPCR foram normalizados com os genes de referência pelo método de comparação Ct (PFAFFL, 2001). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias relativas.

4.12 COMPORTAMENTO E CONSUMO DE ÁGUA

O comportamento dos animais foi avaliado no último dia do período de adaptação durante 24 horas, iniciando-se às 6h. Na baía, os animais foram gravados por câmeras e a avaliação comportamental ocorreu a cada 5 minutos. Quando estavam no momento de socialização, foram avaliados por dois observadores a cada 2 minutos. Foi utilizado um etograma pré-determinado para definição dos comportamentos (CAANITZ et al., 1991) (Tabela 4).

O consumo de água foi realizado com mensurações em balde graduado no último dia da adaptação, iniciando às 6h e totalizando um período de avaliação de 24 horas. A quantidade de água disponível foi padronizada às 6h em 20 litros. Às 18h, após a mensuração do que havia sido consumido, a padronização em 20 litros foi realizada novamente. No dia seguinte, foi apenas mensurado a quantidade consumida. As mensurações obtidas a cada 12 horas foram somadas.

Tabela 4. Etograma utilizado para definição do comportamento dos animais.

EVENTOS COMPORTAMENTAIS	DESCRIÇÃO
ALIMENTAÇÃO	Procura, apreensão, mastigação ou deglutição de alimento.
ÁGUA	Ingestão, deglutição ou procura por água
ÓCIO	Descanso em pé, descanso deitado ou dormindo
DEFECAR	Quantidade de vezes que defecou
URINAR	Quantidade de vezes que urinou
<i>SELF-GROOMING</i>	Lambendo o corpo, mordiscando ou raspando a pele, coçando uma parte do corpo contra outra (pé ou cabeça), esfregando a pele contra outra superfície do corpo ou contra algum objeto no ambiente ou rolando.
INTERAÇÃO SOCIAL POSITIVA	Aproximação, <i>grooming</i> , comportamento lúdico (brincando)
INTERAÇÃO SOCIAL NEGATIVA	Brigas
COMPORTAMENTOS ESTEREOTIPADOS	Pacing, aerofagia, roer madeira, balançar a cabeça, ou andar do urso
OUTROS	Comportamentos não descritos acima.

Fonte: FERREIRA, 2020. Adaptado de Caanitz et al. (1991).

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o modelo misto do pacote PROC MIXED do programa SAS (Statistical Analysis System), considerando uma variância para cada quadrado e os efeitos fixos de período, tratamento e tempo, interação tempo*tratamento, além dos efeitos aleatórios animal dentro de quadrado e resíduo. Quando houve efeito de tratamento ou de interação tempo*tratamento, os dados foram avaliados e, quando possível, submetidos à análise de regressão.

5 RESULTADOS

5.1 PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

A Tabela 5 mostra os resultados para peso e escore de condição corporal (ECC). Não foi observado efeito sobre esses parâmetros nos pôneis avaliados.

Tabela 5. Peso e escore de condição corporal (ECC) (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variáveis	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
Peso (kg)	142,75 $\pm$ 5,99	143,31 $\pm$ 5,99	143,63 $\pm$ 5,99	143,25 $\pm$ 5,99	0,7912
ECC (1-9)	6,81 $\pm$ 0,42	6,75 $\pm$ 0,42	6,50 $\pm$ 0,42	6,44 $\pm$ 0,42	0,1577

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: FERREIRA, 2020.

5.2 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DOS ALIMENTOS

Os resultados obtidos para os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes estão na Tabela 6. Foi observada maior digestibilidade aparente total de extrato etéreo no grupo S2 em comparação ao grupo controle.

Tabela 6. Coeficientes de Digestibilidade Aparente (CDA) (Médias $\pm$ Erro Padrão) dos nutrientes nas fezes de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variáveis	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
CDA MS (%)	63,23 $\pm$ 1,22	65,88 $\pm$ 1,22	65,27 $\pm$ 1,22	66,34 $\pm$ 1,22	0,2035
CDA PB (%)	76,41 $\pm$ 1,97	78,02 $\pm$ 1,97	77,36 $\pm$ 1,97	78,09 $\pm$ 1,97	0,5195
CDA EE (%)	54,55 $\pm$ 4,20 ^B	59,74 $\pm$ 4,20 ^{AB}	59,19 $\pm$ 4,20 ^{AB}	63,75 $\pm$ 4,20 ^A	0,0377
CDA ENN (%)	63,98 $\pm$ 2,83	70,01 $\pm$ 2,83	69,36 $\pm$ 2,83	66,77 $\pm$ 2,83	0,3775
CDA MM (%)	37,14 $\pm$ 3,51	40,94 $\pm$ 3,51	41,03 $\pm$ 3,51	42,69 $\pm$ 3,51	0,5597
CDA FDN (%)	44,09 $\pm$ 1,74	48,74 $\pm$ 1,74	48,03 $\pm$ 1,74	48,33 $\pm$ 1,74	0,1381
CDA FDA (%)	26,86 $\pm$ 3,29	29,76 $\pm$ 3,29	29,70 $\pm$ 3,29	29,12 $\pm$ 3,29	0,8673
CDA MO (%)	65,55 $\pm$ 1,16	68,06 $\pm$ 1,16	67,38 $\pm$ 1,16	68,42 $\pm$ 1,16	0,1437

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: FERREIRA, 2020.

5.3 PARÂMETROS FECAIS

Os ácidos graxos de cadeia curta e o lactato fecais não apresentaram efeitos conforme o grupo experimental (Tabela 7). Houve uma tendência ($p < 0,1$) de maiores valores de butirato para os grupos S1 e S2. O pH fecal também não foi influenciado pela adição do fitoterápico (Tabela 8).

Tabela 7. Concentração molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e lactato (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variáveis	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
Acetato (mM)	13,03 $\pm$ 3,93	16,18 $\pm$ 3,93	12,44 $\pm$ 3,93	14,75 $\pm$ 3,93	0,4047
Propionato (mM)	0,70 $\pm$ 0,60	0,00 $\pm$ 0,60	1,06 $\pm$ 0,60	0,76 $\pm$ 0,60	0,3467
Isobutirato (mM)	0,17 $\pm$ 0,07	0,30 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,07	0,1702
Butirato (mM)	0,13 $\pm$ 0,36	0,96 $\pm$ 0,36	0,16 $\pm$ 0,36	0,49 $\pm$ 0,36	0,0980
Isovalerato (mM)	0,16 $\pm$ 1,20	0,60 $\pm$ 1,20	0,11 $\pm$ 1,20	2,69 $\pm$ 1,20	0,3995
Valerato (mM)	0,17 $\pm$ 0,10	0,30 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,10	0,23 $\pm$ 0,10	0,3291
Total AGCC (mM)	14,35 $\pm$ 4,44	18,34 $\pm$ 4,44	14,10 $\pm$ 4,44	19,20 $\pm$ 4,44	0,4170
Lactato (mM)	11,95 $\pm$ 2,14	9,22 $\pm$ 2,14	14,27 $\pm$ 2,37	9,15 $\pm$ 2,14	0,1408

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: FERREIRA, 2020.

Tabela 8. Valores de pH fecal (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variável	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
pH (0-14)	6,33 $\pm$ 0,14	6,41 $\pm$ 0,14	6,42 $\pm$ 0,14	6,37 $\pm$ 0,14	0,8651

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: FERREIRA, 2020.

5.4 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

Os valores hematológicos e bioquímicos dos pôneis utilizados estão apresentados na Tabela 9. Não houve diferenças nos parâmetros avaliados, apenas albuminas apresentou uma diminuição no grupo S2 em relação ao grupo controle.

Tabela 9. Valores hematológicos e bioquímicos (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variáveis	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
<i>Hemograma</i>					
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	6,89 ± 0,28	6,89 ± 0,28	6,73 ± 0,28	6,65 ± 0,28	0,2411
Hemoglobina (g/dl)	11,80 ± 0,53	11,81 ± 0,53	11,75 ± 0,53	11,37 ± 0,53	0,3315
Hematócrito (%)	33,35 ± 1,69	33,30 ± 1,69	32,40 ± 1,69	32,06 ± 1,69	0,2423
VCM (fL)	48,40 ± 1,78	48,50 ± 1,78	48,31 ± 1,78	48,34 ± 1,78	0,9892
HCM (pg)	17,12 ± 0,53	17,14 ± 0,53	17,45 ± 0,53	17,14 ± 0,53	0,5196
CHCM (%)	35,47 ± 0,70	35,47 ± 0,70	36,21 ± 0,70	35,52 ± 0,70	0,2810
Plaquetas (x10 ³ /μL)	171,75 ± 0,01	172,75 ± 0,01	170,62 ± 0,01	172,00 ± 0,01	0,9856
<i>Leucograma</i>					
Leucócitos (x10 ³ /μL)	6,20 ± 0,60	6,20 ± 0,60	6,00 ± 0,60	5,99 ± 0,60	0,6605
Neutrófilos seg. (x10 ³ /μL)	3,26 ± 0,41	3,11 ± 0,41	3,08 ± 0,41	3,13 ± 0,41	0,8811
Linfócitos (x10 ³ /μL)	2,50 ± 0,28	2,66 ± 0,28	2,55 ± 0,28	2,46 ± 0,28	0,7024
Monócitos (x10 ³ /μL)	0,16 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,4231
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	0,29 ± 0,06	0,25 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,27 ± 0,06	0,8028
<i>Análises bioquímicas</i>					
Uréia (mg/dL)	33,84 ± 2,08	34,51 ± 2,08	33,98 ± 2,08	34,84 ± 2,08	0,3678
Creatinina (mg/dL)	1,23 ± 0,05	1,23 ± 0,05	1,21 ± 0,05	1,19 ± 0,05	0,1880
AST (U/L)	340,50 ± 34,34	341,13 ± 34,34	333,13 ± 34,34	329,75 ± 34,34	0,7035
GGT (U/L)	62,00 ± 32,04	56,13 ± 32,04	63,50 ± 32,04	59,63 ± 32,04	0,5019
Albumina (g/dL)	3,10 ± 0,11 ^A	3,06 ± 0,11 ^{AB}	3,01± 0,11 ^{AB}	2,97± 0,11 ^B	0,0055
Globulina (g/dL)	3,53 ± 0,17	3,50 ± 0,17	3,57 ± 0,17	3,57 ± 0,17	0,8522
Albumina/Globulina	0,90 ± 0,05	0,88 ± 0,05	0,85 ± 0,05	0,84 ± 0,05	0,3150
Bilirrubina total (mg/dL)	0,56 ± 0,07	0,63 ± 0,07	0,63 ± 0,07	0,64 ± 0,07	0,7944

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: FERREIRA, 2020.

5.5 GLUTATIONA PEROXIDASE ERITROCITÁRIA

Os resultados para glutathione peroxidase eritrocitária estão na Tabela 10. Não houve diferença entre os grupos, ou seja, não houve alteração do estresse oxidativo das células.

Tabela 10. Glutathione peroxidase eritrocitária (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variável	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
Glutathione peroxidase eritrocitária (U/L)	26,72 $\pm$ 2,39	28,24 $\pm$ 2,39	28,32 $\pm$ 2,39	25,66 $\pm$ 2,39	0,2072

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: FERREIRA, 2020.

5.6 METABOLISMO ENERGÉTICO

As funções relacionadas ao metabolismo energético foram avaliadas pela mensuração de colesterol e triglicérides em jejum, glicose e insulina basais e as áreas abaixo da curva de glicose e insulina. Os resultados para colesterol e triglicérides estão demonstrados na Tabela 11, sendo possível observar uma alteração de triglicérides no grupo S1 em relação ao grupo controle.

Tabela 11. Colesterol e triglicérides de pôneis (Médias $\pm$ Erro Padrão) recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variáveis	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
Colesterol (mg/dl)	98,49 $\pm$ 7,17	97,23 $\pm$ 7,17	107,93 $\pm$ 7,17	96,98 $\pm$ 7,17	0,3973
Triglicérides (mg/dl)	37,24 $\pm$ 6,87 ^A	29,87 $\pm$ 6,87 ^B	34,51 $\pm$ 6,87 ^{AB}	34,89 $\pm$ 6,87 ^{AB}	0,0429

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Médias $\pm$ Erro Padrão.

FONTE: FERREIRA, 2020.

Os valores basais e as áreas abaixo da curva de glicose plasmática e insulina sérica não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais (Tabela 12). As curvas glicêmica e insulinêmica estão representadas nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

Tabela 12. Glicemia basal, insulinemia basal e área abaixo da curva (AAC) de glicose e insulina (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido e diferentes concentrações de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variáveis	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
<i>Glicose plasmática (mmol/L)</i>					
Basal	4,69 ± 0,25	5,01 ± 0,25	4,59 ± 0,25	4,79 ± 0,25	0,2941
AAC (mmol/L*h ⁻¹)	34,25 ± 2,33	33,66 ± 2,33	31,30 ± 2,33	32,44 ± 2,33	0,2352
<i>Insulina sérica (μUI/mL)</i>					
Basal	49,03 ± 12,16	26,50 ± 12,16	29,74 ± 12,16	28,82 ± 12,16	0,3886
AAC (μUI/mL*h ⁻¹)	2444,12 ± 686,60	2597,59 ± 686,60	2174,73 ± 686,60	2022,68 ± 686,60	0,5916

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Médias $\pm$ Erro Padrão.

FONTE: FERREIRA, 2020.

Gráfico 1. Gráfico da curva glicêmica ($\text{mmol/L} \cdot \text{h}^{-1}$) de pôneis recebendo dietas com altos níveis de carboidratos solúveis e diferentes concentrações de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Fonte: FERREIRA, 2020.

Gráfico 2. Gráfico da curva insulinêmica ($\mu\text{UI/mL} \cdot \text{h}^{-1}$) de pôneis recebendo dietas com altos níveis de carboidratos solúveis e diferentes concentrações de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Fonte: FERREIRA, 2020.

5.7 INFLAMAÇÃO LOCAL

Os dados de espessura de parede intestinal do cólon direito dorsal estão na Tabela 13. Os grupos tratados apresentaram menores espessuras de parede intestinal quando comparados ao grupo controle, que não recebeu a adição do fitoterápico à dieta.

Tabela 13. Espessura da parede intestinal (Médias $\pm$ Erro Padrão) de cólon dorsal direito de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variável	Tratamentos				P Valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
Parede intestinal (mm)	3,08 $\pm$ 0,20 ^A	2,59 $\pm$ 0,20 ^B	2,53 $\pm$ 0,20 ^B	2,44 $\pm$ 0,20 ^B	0,0071

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: FERREIRA, 2020.

5.8 INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

Não houve diferença significativa nos valores de fibrinogênio entre os grupos experimentais, como demonstrado na Tabela 14. A expressão gênica das interleucinas 6 e 10 também não diferiu entre os grupos (Tabela 15 e Gráfico 3).

Tabela 14. Fibrinogênio (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variáveis	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
Fibrinogênio (mg/dL)	225,00 $\pm$ 34,28	275,00 $\pm$ 34,28	212,50 $\pm$ 34,28	250,00 $\pm$ 34,28	0,3310

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: FERREIRA, 2020.

Tabela 15. Expressão gênica de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variáveis	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
IL-6	0,2019 $\pm$ 0,1836	0,0857 $\pm$ 0,0506	0,0561 $\pm$ 0,0477	0,0569 $\pm$ 0,0344	0,3533
IL-10	0,0253 $\pm$ 0,0132	0,0144 $\pm$ 0,0056	0,0122 $\pm$ 0,0067	0,0167 $\pm$ 0,0109	0,4017

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: FERREIRA, 2020.

Gráfico 3. Expressão gênica de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Fonte: FERREIRA, 2020.

5.9. COMPORTAMENTO E CONSUMO DE ÁGUA

As avaliações de comportamento dos animais quando confinados (Tabela 16) ou soltos não mostraram diferenças entre os grupos, tanto na questão de comportamento de ingestão ou desenvolvimento de estereotípias. O consumo de água diário também não foi alterado conforme os tratamentos. Os valores de consumo de água estão colocados na Tabela 17.

Tabela 16. Duração, em minutos, da demonstração de comportamentos pré-definidos (Médias $\pm$ Erro Padrão) por pôneis, durante confinamento individual em baias, recebendo dieta com alto nível de amido e suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variável	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
Alimentação (min)	506,25 $\pm$ 49,46	461,25 $\pm$ 49,46	488,13 $\pm$ 49,46	507,5 $\pm$ 49,46	0,4953
Água (min)	18,12 $\pm$ 6,29	26,87 $\pm$ 6,29	21,87 $\pm$ 6,29	17,50 $\pm$ 6,29	0,5526
Ócio (min)	816,88 $\pm$ 51,07	855,00 $\pm$ 51,07	835,63 $\pm$ 51,07	823,13 $\pm$ 51,07	0,6673
Fezes (min)	13,12 $\pm$ 4,04	13,12 $\pm$ 4,04	10,00 $\pm$ 4,04	14,37 $\pm$ 4,04	0,5336
Urina (min)	3,75 $\pm$ 2,85	6,87 $\pm$ 2,85	6,25 $\pm$ 2,85	5,62 $\pm$ 2,85	0,6790
Self-grooming (min)	3,75 $\pm$ 1,84	4,37 $\pm$ 1,84	3,75 $\pm$ 1,84	1,25 $\pm$ 1,84	0,5997
Estereotipias (min)	4,37 $\pm$ 2,77	0 $\pm$ 2,77	3,12 $\pm$ 2,77	1,87 $\pm$ 2,77	0,7253
Outros (min)	43,75 $\pm$ 18,42	42,50 $\pm$ 18,42	41,25 $\pm$ 18,42	38,75 $\pm$ 18,42	0,5060

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: FERREIRA, 2020.

Gráfico 4. Tempo dedicado (%) para cada comportamento pré-definido por pôneis em confinamento individual, recebendo dieta com altos níveis de carboidratos não estruturais.

Fonte: FERREIRA, 2020.

Gráfico 5. Tempo dedicado (%) para cada comportamento pré-definido por pôneis recebendo dieta com alto nível de amido quando soltos em grupo por 1 hora.

Fonte: FERREIRA, 2020.

Tabela 17. Consumo de água diário (Médias $\pm$ Erro Padrão) de pôneis recebendo dieta com alto nível de amido suplementados com diferentes níveis de fitoterápico à base de *Macleaya cordata*.

Variáveis	Tratamentos				P valor
	Controle	S1	S1,5	S2	
Consumo de água (L)	7,66 $\pm$ 1,01	8,69 $\pm$ 1,01	8,94 $\pm$ 1,01	7,31 $\pm$ 1,01	0,1623

Letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: FERREIRA, 2020.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo indica que a suplementação de equinos com *Macleaya cordata* é segura para a espécie, altera a digestibilidade dos alimentos e influencia o metabolismo de lipídeos, além de modular a resposta imune no trato gastrointestinal.

O uso do fitoterápico não alterou o peso ou escore de condição corporal dos pôneis suplementados, resultados compatíveis com os observados por Estrada-Ângulo et al. (2016) e Faehnrich et al. (2019). Contudo, outros estudos obtiveram maiores pesos finais em ratos, frangos de corte e porcos (VRUBLOVA et al., 2008; KHADEM et al., 2014; KANTAS et al., 2015). Em relação ao tempo de suplementação, os trabalhos variaram de 21 dias a 90 dias de fornecimento do extrato de *Macleaya cordata*, portanto, o tempo de suplementação não interferiu nos resultados encontrados.

O aumento de peso encontrado em alguns estudos pode estar relacionado à melhora na digestibilidade dos componentes da dieta. Vrublova et al. (2008), Kantas et al. (2015) e Estrada-Ângulo et al. (2016) observaram menor conversão alimentar em ratos, porcos e ovelhas, respectivamente. A digestibilidade de extrato etéreo (EE) foi influenciada positivamente no estudo atual, sendo que o grupo S2 apresentou maior digestibilidade em comparação ao grupo controle.

Em relação ao EE, Kronfeld et al. (2004) mostraram que a digestibilidade para dietas envolvendo feno e grãos de cereais com quantidades parecidas dos mesmos e em uma proporção similar é de 55%. No atual trabalho, o concentrado utilizado apresentou três vezes mais EE em relação ao feno e a proporção de concentrado foi maior do que de volumoso. Isso explicaria encontrar digestibilidade um pouco mais alta na dieta utilizada, já que grãos apresentam digestibilidade aparente de EE entre 55 e 76%, contra 42 a 49% para fenos (FONNESBECK et al., 1967; KANE et al., 1979; STURGEON et al., 2000).

Ainda, em estudo avaliando o uso de dietas ricas em amido (2,4 g por kg de PC por refeição), Swyers et al. (2008) encontraram maior digestibilidade de extrato etéreo quando suplementaram cavalos com um probiótico envolvendo as seguintes espécies: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium*. Essas bactérias são produtoras de ácido láctico e conhecidas por melhorar a saúde digestiva (SWYERS et al., 2008). Assim, a melhora da digestibilidade de extrato etéreo com a adição de fitoterápico à base de *Macleaya*

cordata pode estar relacionada a uma possível seleção de bactérias benéficas no trato gastrointestinal. Essa possibilidade de modulação da microbiota residente é reforçada pelos achados nos parâmetros fecais: pH, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido láctico.

O pH do trato gastrointestinal dos equinos interfere na quebra da celulose e hemicelulose, além de influenciar no transporte dos AGCC através do epitélio intestinal. Grandes quantidades de carboidratos rapidamente fermentáveis na dieta de equinos podem trazer graves consequências à saúde dos mesmos, alterações na microbiota residente, maior incidência de gastrite, entre outros (CIPRIANO-SALAZAR et al., 2019). Os valores de pH fecal encontrados no presente estudo são compatíveis com os relatados por Willing et al. (2009) e Van Den Berg et al. (2013) para animais recebendo dieta de base forragem e concentrado, mas menor em relação aos achados de Zeyner et al. (2004), Hansen et al. (2015), Correa et al. (2016), Harlow et al. (2016) e Johnson & Rossow (2019). Contudo, os achados não caracterizam quadros de acidose, sendo estes relacionados a valores de pH abaixo de 5,8 (CIPRIANO-SALAZAR et al., 2019).

Embora sem sinais de acidose, as quantidades de ácido láctico encontradas no presente estudo são preocupantes, sendo muito maiores do que o encontrado em outros trabalhos (ZEYNER et al., 2004; DALY et al., 2012). Fornecimento de quantidades maiores que 1 g de amido por kg de PC por refeição leva ao escape de amido da digestão enzimática em intestino delgado, o qual acaba tendo como destino o intestino grosso, onde é fermentado por bactérias (GARBER et al., 2020). A menor média obtida nos grupos experimentais utilizados no presente estudo chegou a ser 1,5 vezes maior do observado para cavalos com obstrução e distensão simples do cólon (DALY et al., 2012).

Outro fator de atenção foi que as concentrações molares de ácidos graxos de cadeia curta foram muito inferiores ao relatado por Zeyner et al. (2004) e Daly et al. (2012). Os valores de acetato foram similares aos achados de Feltre (2017) avaliando pôneis recebendo dietas completas com diferentes processamentos e fontes de fibra. Contudo, propionato, butirato, isobutirato, valerato e isovalerato foram encontrados em concentrações baixíssimas (ZEYNER et al., 2004; DALY et al., 2012; FELTRE, 2017).

O fornecimento de dietas ricas em amido leva ao aumento no ceco de bactérias dos filos *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Tenericutes*, além de diminuir a

diversidade da microbiota (HANSEN et al., 2015). Outro estudo demonstrou que o aumento progressivo de concentrado na dieta de animais previamente mantidos em dieta exclusiva de forragem leva ao aumento das populações de *Streptococcus spp.*, relacionadas a problemas gastrointestinais. *Lactobacillus spp.* aumentam ao longo dos dias (VAN DEN BERG et al., 2013), assim como as bactérias utilizadoras de lactato. A quantidade de lipopolissacarídeo (LPS) no ceco e nas fezes também aumentam por conta desse tipo de transição alimentar (GRIMM et al., 2018).

Quando o amido é proveniente de milho, o aumento das bactérias amilolíticas e a diminuição das celulolíticas são favorecidos. O aumento é muito maior nesses casos do que quando a fonte do amido é aveia. Ocorre predomínio de *Enterococcus faecalis* nas populações de amilolíticas, favorecimento de bactérias coccus gram-positivas (GPC), queda nos números de *lactobacilli* e queda nas bactérias utilizadoras de lactato presentes nas fezes (HARLOW et al., 2016). Portanto, a fonte de amido precisa ser considerada. Essas alterações populacionais pelo uso de amido de milho poderiam justificar a altíssima quantidade de lactato nas fezes, com favorecimento de bactérias amilolíticas e detrimento das bactérias utilizadoras de lactato.

No presente estudo, a produção de acetato predominou em relação aos outros AGCC. A produção do mesmo está relacionada a uma maior diversidade da microbiota e à degradação de fibra (GARBER et al., 2020). O achado é curioso e controverso, pois era esperado que as bactérias fibrolíticas aparecessem em menor quantidade em uma dieta rica em concentrado, diminuindo as quantidades de acetato e aumentando propionato (HANSEN et al., 2015). Porém, a concentração total de AGCC estava baixa. Baixas concentrações totais são encontradas em pessoas com problemas no trato gastrointestinal, estando relacionadas a doenças como síndrome do intestino irritável, doença cardiovascular, diarreia e câncer (HUDA-FAUJAN et al., 2010). Os achados fecais sugerem que os animais estavam em elevado risco de desenvolvimento de doença.

Não foram observadas alterações nas concentrações de AGCC pela adição do fitoterápico, mas uma tendência de maiores valores de butirato para os grupos S1 e S2 ocorreu. O butirato é um produto da fermentação da fibra, importante fonte de energia para o cavalo e essencial para as células epiteliais do cólon. Ele diminui a expressão de genes pró-inflamatórios na parede intestinal e é transportado através da mesma pela proteína transportadora monocarboxilada 1 (MCT1), sendo

influenciado pelo gradiente de pH. Acetato, propionato e lactato interferem negativamente na captação do butirato (NEDJADI et al., 2014). A tendência encontrada indica um possível favorecimento das bactérias degradadoras de fibra e uma mitigação dos impactos das altas quantidades de lactato produzidas pelas bactérias amilolíticas no intestino grosso.

A microbiota residente e os produtos produzidos por ela são essenciais para a manutenção da saúde local e da integridade da parede intestinal (LACOB & LACOB, 2019). Junto aos achados fecais, a avaliação dos parâmetros sanguíneos ajudou a compreender o impacto sistêmico das alterações gastrointestinais encontradas.

Primeiramente, avaliando-se o metabolismo lipídico por meio do colesterol e triglicérides séricos, foram obtidos valores dentro da normalidade para a espécie (VIANA, 2007; FELTRE, 2017). Neste estudo, os animais não desenvolveram problemas no metabolismo lipídico, apesar de dietas ricas em amido ou glicose levarem a maiores concentrações de triacilgliceróis (GEELLEN et al., 2000). Ainda, foi observada uma diferença entre o grupo controle e o grupo S1 em relação a triglicérides em jejum, sendo que o último apresentou uma média menor. Menores concentrações totais de triglicérides estão relacionadas ao aumento do fluxo de ácidos graxos e aumento da atividade de LPL no músculo com consequente aumento da capacidade oxidativa muscular. Porém, esses achados estão relacionados ao fornecimento de dietas ricas em gordura (GEELLEN et al., 1999; GEELLEN et al. 2001b).

O estresse crônico poderia levar ao aumento da atividade de LPL no músculo (RICART-JANÉ et al., 2005) e à diminuição dos níveis de triglicérides circulantes (RICART-JANÉ et al., 2002), conforme observado em ratos, mas não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais em relação ao comportamento, não justificando o observado em S1. Portanto, provavelmente, o efeito se deu por alguma influência direta no metabolismo energético dos animais (BOIVIN & DESHAIES, 2000).

O consumo de alimentos de alto índice glicêmico e os altos níveis de insulina persistentes afetam a atividade de LPL nos tecidos. Enquanto sua ação é potencializada no tecido adiposo, no músculo ela é reduzida. O alto nível de lipídeos circulantes, junto à hiperinsulinemia, também ajuda a diminuir a atividade enzimática no tecido muscular (BOIVIN & DESHAIES, 2000). Como os níveis de triglicérides e

colesterol encontrados foram normais para a espécie, o efeito observado no grupo S1 poderia estar relacionado a alguma modulação na sensibilidade tecidual à insulina.

Todavia, os valores encontrados para glicemia e insulinemia não diferiram entre os grupos experimentais. A dieta induziu um aumento massivo da glicose plasmática e, conseqüentemente, uma resposta insulinêmica intensa. As médias obtidas para glicemia basal foram compatíveis com o observado em pôneis saudáveis alimentados com fibra e desafiados por teste oral de glicose com 1,5 g/ kg/ PC (BAMFORD et al., 2014). Contudo, os animais do presente estudo apresentaram resistência à insulina acentuada.

Em cavalos adultos, a alimentação rica em amido leva a maior valor de insulina basal do que uma dieta rica em açúcar. Hiperinsulinemia relativa pós-prandial também é observada nesses animais (JACOB et al., 2018). Dietas ricas em amido e açúcar induzem a diminuição da sensibilidade à insulina, principalmente em equinos não obesos (HOFFMAN et al., 2003; TREIBER et al., 2005), como era a condição dos animais utilizados neste experimento.

Altos níveis de carboidratos não estruturais na alimentação tendem a aumentar os valores de insulina basal e levam a maior área abaixo da curva de insulina e pico de insulina pós-prandial. O número de refeições, ou seja, a divisão do total de carboidratos não estruturais fornecidos no dia, tem uma tendência em aumentar a insulinemia basal, todavia sua influência no metabolismo glicêmico e insulinêmico é baixa (PRATT-PHILLIPS et al., 2014). Outro ponto a ser considerado é que pôneis apresentam resposta insulinêmica distinta em relação a outras raças, sendo a mesma muito mais intensa. São animais que apresentam tendência a desenvolver hiperinsulinemia conforme os componentes da dieta (BAMFORD et al., 2014; BAMFORD et al., 2015).

A época do ano também influencia a insulina basal e o valor de seu pico. Em outono, pôneis apresentam médias maiores, as quais ainda variam conforme a dieta (BORER et al., 2012). O estudo atual foi realizado durante o inverno e início da primavera, o que pode ter levado a maiores concentrações basais de insulina. De qualquer forma, o fato de os animais terem desenvolvido resistência à insulina decorrente da dieta é preocupante já que isto pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de hiperlipemia, osteocondrose, cólica e laminite (HOFFMAN et al., 2009).

Ainda, sabendo do impacto das dietas ricas em carboidratos não estruturais sobre a imunidade local e as respostas inflamatórias sistêmicas (KALCK, 2009; ONISHI et al., 2012; ROTH-WALTER et al., 2017), foram avaliadas espessura da parede intestinal do cólon dorsal direito e parâmetros inflamatórios sistêmicos. Foi comprovado pela ultrassonografia que a alta proporção de concentrado rico em amido da dieta estabelecida levou à inflamação intestinal no grupo controle. Todavia, o espessamento encontrado não caracterizou quadro de colite, no qual a parede intestinal encontra-se edemaciada e com espessura acima de 5 mm (MEDINA-TORRES, 2018).

Os quadros de colite também envolvem outros achados como sequestro de fluido para o lúmen, desconforto abdominal, transporte iônico anormal, hipovolemia, desidratação severa, endotoxemia e leucopenia (MEDINA-TORRES, 2018). Os cavalos acometidos ainda podem apresentar hipoproteïnemia severa com hipoalbuminemia que levam a edema ventral e de membros (JONES et al., 2003; GALVIN et al., 2004). Sinais de depressão, diarreia, perda de peso e linfadenopatia cecal tendem a estar relacionados a casos de óbito pelo quadro (BISCOE et al., 2018). A ausência desses achados clínicos e laboratoriais no grupo controle confirma a não ocorrência de colite no presente estudo.

Como já observado em outras espécies (VRUBLOVA et al., 2010; SOLER et al., 2016; CHEN et al., 2020), o fitoterápico à base de *Macleaya cordata* teve efeito anti-inflamatório local, sendo que todos os grupos tratados mantiveram a espessura de parede intestinal dentro da normalidade para pôneis (SIWINSKA et al., 2017). Porém, o efeito anti-inflamatório sistêmico encontrado em outros estudos (NIU et al., 2012; WANG et al., 2017) não ocorreu nos parâmetros avaliados, apesar da evidente diferença numérica entre o grupo controle e os grupos tratados.

Em primeiro lugar, esse fato poderia ser explicado pela farmacocinética da sanguinarina, principal componente ativo da planta, que tem absorção de apenas 2% no trato gastrointestinal (PSOTOVA et al., 2006), caracterizando um efeito mais local, e não sistêmico. Os efeitos sistêmicos encontrados anteriormente, em administração por via oral, podem estar relacionados a utilização de doses mais altas (WANG et al., 2017).

Em segundo lugar, fibrinogênio é uma proteína de fase aguda e começa a aumentar após 24 a 72 horas da injúria, podendo atingir o pico em até uma semana e se manter alto por diversas semanas (JACOBSEN et al., 2007). Ele se encontra

aumentado em cavalos com inflamação sistêmica (acima de 400 mg/dl) e, quanto mais alto, pior o prognóstico do animal. Contudo, sua sensibilidade para inflamação sistêmica é baixa, sendo sua especificidade mais alta (BORGES et al., 2007; CORRADINI et al., 2014). Essa baixa sensibilidade para inflamação sistêmica pode ter sido responsável pelo resultado encontrado. Por isso, foi importante associar sua mensuração com outros parâmetros inflamatórios, no caso a expressão gênica das interleucinas.

Porém, as citocinas também não foram influenciadas pelos grupos experimentais. A ausência de significância pode ter ocorrido pela dificuldade em conseguir dosar os picos das interleucinas, já que a alta quantidade de amido da dieta estaria induzindo uma resposta inflamatória crônica. A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica que possui diversas funções biológicas, podendo ser produzida por diversas células linfóides e não linfóides (NAKA et al., 2002). O estímulo para sua produção vem de células que possuem receptores que reconhecem patógenos (PRRs), como os receptores Toll-like (TLRs), e pela produção de DAMPs, os quais são padrões moleculares associados ao dano. Eles estimulam diversas vias inflamatórias, incluindo NF- κ B, a qual aumenta a síntese de IL-6, fator de necrose tumoral e IL-1 β (TANAKA et al., 2014). A meia-vida dos componentes envolvidos na sinalização de IL-6 varia muito, mas a maioria não tem meia-vida superior a 3 horas (HEINRICH et al., 2003), ou seja, seu pico de produção é muito rápido. Neste experimento, não foi possível definir o momento exato do dano. Isto porque os animais estavam sendo expostos diariamente à dieta e existem questões individuais de adaptação à alimentação e à velocidade de trânsito do trato gastrointestinal. Portanto, provavelmente, IL-6 não foi mensurada no momento de pico em todos os indivíduos.

Contudo, a média do grupo controle, que chegou a ser quatro vezes a média dos grupos tratados, pode ser um indicativo de inflamação, que não foi comprovado estatisticamente pela grande variação existente dentro do grupo. Essa variação pode ser decorrente, justamente, dos momentos distintos de pico de produção. Os grupos tratados não apresentaram variação tão grande, fato que poderia estar relacionado à grande ação dos componentes de *Macleaya cordata* sobre a via inflamatória NF- κ B, inibindo a ocorrência de inflamação sistêmica nos mesmos (GALADARI et al., 2017).

Outro ponto é que, na inflamação crônica, a produção e exposição constante das células efectoras Th17 a IL-6 e TGF- β acarreta na síntese de interleucina-10, importante regulador do potencial destrutivo da resposta mediada por Th17 (MCGEACHY et al., 2007). Sua produção também é realizada por macrófagos, células B e outras células, incluindo mastócitos e queratinócitos, os quais também inibem a resposta de células T. Em infecções com exposição a LPS, essa citocina passa a ser detectada após 8 horas do contato (CONTI et al., 2003). Seu papel regulatório é essencial na fase de resolução da inflamação (OUYANG et al., 2011) e é tão importante que ratos deficientes na produção de IL-10 desenvolvem colite espontaneamente (YEN et al., 2006; IP et al., 2017). Embora sem diferença estatística, IL-10 também aparece sendo mais expressa no grupo controle em relação aos tratados. Sua variação nos animais do controle também foi grande, podendo ser justificada da mesma forma que o ocorrido com IL-6.

Por fim, a dieta pode não ter levado a uma inflamação local severa a ponto de perturbar a barreira intestinal e levar à ativação maciça do sistema imune com reflexos sistêmicos. Isso porque outras alterações clínicas e laboratoriais seriam encontradas, como anemia e alteração no número de plaquetas, pois, em inflamações crônicas, IL-6 acaba levando a hipozincemia, hipoferremia, anemia e liberação de plaquetas (NAKA et al., 2002; TANAKA et al., 2014).

Um dos pontos críticos do estudo era definir se o uso do fitoterápico à base de *Macleaya cordata* seria seguro para equinos, já que não existem trabalhos na espécie. Todos os exames laboratoriais se mantiveram dentro da normalidade para a espécie ao longo de todo o experimento, com exceção de GGT. A média de GGT dos pôneis utilizados já se encontrava alta antes do início do experimento (APÊNDICE A), já que os valores normais para equinos variam de 4 a 13,4 U/L (VIANA, 2007). Contudo, pôneis podem apresentar diferenças em parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados habitualmente na clínica. Pôneis Shetland saudáveis apresentam valor médio normal da enzima GGT de $15,11 \pm 2,63$ ou $24,78 \pm 6,78$ U/L, conforme a época do ano, sendo a variação encontrada de 8 a 65 U/L (SHAWAF et al., 2018).

Apesar da média inicial alta no presente estudo, todos os animais foram considerados aptos para o experimento, pois se apresentavam normais em todos os aspectos clínicos avaliados e nos outros exames laboratoriais realizados. Ademais, não houve influência do grupo experimental sobre as médias de GGT, apesar das

mesmas continuarem altas. Os valores hematológicos e bioquímicos achados nos outros parâmetros avaliados estão de acordo com o relatado por Tyler et al. (1987) e Viana (2007), respectivamente. Os valores encontrados para a atividade de glutathione peroxidase em sangue total também estão compatíveis com aqueles descritos para equinos (CALAMARI et al., 2009).

A ausência de efeitos nos parâmetros sanguíneos é compatível com o relatado na literatura (VRUBLOVA et al., 2008; FAEHNRICH et al., 2018). Apenas albumina apresentou menor média no grupo S2 em relação ao grupo controle, mas mantendo-se ainda dentro da normalidade (VIANA, 2007). Esses resultados indicam que o uso do fitoterápico em até 2 mg/kg de PC é seguro.

Não houve alterações em comportamento ou consumo de água conforme grupo experimental, mas o tempo em ócio foi igual a 60% e em alimentação a 36%. Em dietas ricas em fibra e mais similares ao que os equinos possuíam na natureza, os animais passam a maior parte do tempo se alimentando, exploram bastante o ambiente e são menos reativos a situações ou objetos novos (HOTHERSALL & NICOLL, 2009). Dietas com alto amido foram relacionadas à diminuição do comportamento exploratório do ambiente, queda no consumo de água (FREIRE et al., 2009) e à maior reatividade de cavalos (BULMER et al., 2015).

Maior reatividade e tempo gasto em vigilância foram relacionados ao estresse alimentar pelas altas quantidades de amido, as quais aumentam as populações bacterianas amilolíticas no intestino grosso (DESTREZ et al., 2015; DESTREZ et al., 2019). Além disso, serotonina, um neurotransmissor envolvido em diversos processos comportamentais e fisiológicos, encontra-se diminuída em equinos recebendo dieta rica em amido e poderia estar associada a quadros de estereotipia (ALBERGHINA et al., 2010), embora os pôneis utilizados não tenham apresentado comportamentos estereotipados.

O consumo de água no presente estudo foi parecido com o relatado na literatura (NYMAN & DAHLBORN, 2001; FREEMAN et al., 2020), sendo um consumo médio de 54,3 ml/ kg/ dia. A ausência de efeito da adição do fitoterápico à base de *Macleaya cordata* é compatível com o observado em ovelhas suplementadas (ESTRADA-ÂNGULO et al., 2016).

7 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a adição de fitoterápico comercial à base de *Macleaya cordata* à dieta de equinos recebendo altos níveis de carboidratos não estruturais é segura e benéfica. Seu uso propicia maior digestibilidade da dieta e favorece a saúde digestiva dos animais ao modular a resposta imune do trato gastrointestinal. Efeitos sistêmicos positivos ou negativos não foram observados, indicando que o efeito do fitoterápico é local. Assim, o uso dos componentes de *Macleaya cordata* comprova ter grande potencial para a espécie equina, embora mais estudos precisem ser realizados a fim de avaliar seus efeitos em outras categorias animais.

REFERÊNCIAS

- AL JASSIM, R. A., ANDREWS, F. M. The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 25, n. 2, p. 199-215, 2009.
- ALBERGHINA, D., GIANNETTO, C., VISSER, E. K., ELLIS, A. D. Effect of diet on plasma tryptophan and serotonin in trained mares and geldings. **Veterinary Record**, v. 166, n. 5, p. 133-136, 2010.
- ARONOFF, S. L., BERKOWITZ, K., SHREINER, B., WANT, L. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. **Diabetes spectrum**, v. 17, n. 3, p. 183-190, 2004.
- ASPLIN, L. E., SILLENCE, M. N., POLLITT, C. C., MCGOWAN, C. M. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. **The veterinary journal**, v. 174, p. 530-535, 2007.
- ASPLIN, K. E., CURLEWIS, J. D., MCGOWAN, C. M., POLLITT, C. C., SILLENCE, M. N. Glucose transport in the equine hoof. **Equine veterinary journal**, v. 43, n. 2, p. 196-201, 2011.
- BAMFORD, N. J., POTTER, S. J., HARRIS, P. A., BAILEY, S. R. Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. **Domestic animal endocrinology**, v. 47, p. 101-107, 2014.
- BAMFORD, N. J., BASKERVILLE, C. L., HARRIS, P. A., BAILEY, S. R. Postprandial glucose, insulin, and glucagon-like peptide-1 responses of different equine breeds adapted to meals containing micronized maize. **Journal of animal science**, v. 93, n. 7, p. 3377-3383, 2015.
- BISCOE, E. W., WHITCOMB, M. B., VAUGHAN, B., DECHANT, J. E., MAGDESIAN, K. G. Clinical features and outcome in horses with severe large intestinal thickening diagnosed with transabdominal ultrasonography: 25 cases (2003–2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 253, n. 1, p. 108-116, 2018.
- BOIVIN, A., & DESHAIES, Y. Contribution of hyperinsulinemia to modulation of lipoprotein lipase activity on the obese Zucker rat. **Metabolism**, v. 49, n. 1, p. 134-140, 2000.

BORCHERS, A. T., SELMI, C., MEYERS, F. J., KEEN, C. L., GERSHWIN, M. E. Probiotics and immunity. **Journal of gastroenterology**, v. 44, n. 1, p. 26-46, 2009.

BORER, K. E., BAILEY, S. R., MENZIES-GOW, N. J., HARRIS, P. A., ELLIOTT, J. Effect of feeding glucose, fructose, and inulin on blood glucose and insulin concentrations in normal ponies and those predisposed to laminitis. **Journal of animal science**, v. 90, n. 9, p. 3003-3011, 2012.

BORGES, A. S., DIVERS, T. J., STOKOL, T., MOHAMMED, O. H. Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 21, n. 3, p. 489-494, 2007.

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

BRUHN, O., PAUL, S., TETENS, J., & THALLER, G. The repertoire of equine intestinal α -defensins. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, 631, p.1-13, 2009.

BULMER, L., MCBRIDE, S., WILLIAMS, K., MURRAY, J. A. The effects of a high-starch or high-fibre diet on equine reactivity and handling behaviour. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 165, p. 95-102, 2015.

CAANITZ, H., O'LEARY, L., HOUP, K., PETERSSON, K., HINTZ, H. Effect of exercise on equine behavior. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 31, n. 1-2, p. 1-12, 1991.

CALAMARI, L.; FERRARI, A.; BERTIN, G. Effect of selenium source and dose on selenium status of mature horses. **Journal of animal science**, v. 87, n. 1, p. 167-178, 2009.

CARSLAKE, H. B., PINCHBECK, G. L., MCGOWAN, C. M. Evaluation of a chemiluminescent immunoassay for measurement of equine insulin. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 31, n. 2, p. 568-574, 2017.

CHEN, K., LIU, Y., CHENG, Y., YAN, Q., ZHOU, C., HE, Z., ZENG, J., HE, J., TAN, Z. Supplementation of *Lactobacillus plantarum* or *Macleaya cordata* Extract Alleviates Oxidative Damage Induced by Weaning in the Lower Gut of Young Goats. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 548-558, 2020.

CHRISTOFFERSEN, M., WOODWARD, E. M., BOJESEN, A. M., PETERSEN, M. R., SQUIRES, E. L., LEHN-JENSEN, H., TROEDSSON, M. H. T. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 991-1004, 2012.

CIPRIANO-SALAZAR, M., ADEGBEYE, M. J., ELGHANDOUR, M. M., BARBABOSA-PILEGO, A., MELLADO, M., HASSAN, A., SALEM, A. Z. The dietary components and feeding management as options to offset digestive disturbances in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 74, p. 103-110, 2019.

CONTI, P., KEMPURAJ, D., KANDERE, K., DI GIOACCHINO, M., BARBACANE, R. C., CASTELLANI, M. L., FELACO, M., BOUCHER, W., LETOURNEAU, R., THEOHARIDES, T. C. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. **Immunology letters**, v. 86, n. 2, p. 123-129, 2003.

CORRADINI, I., ARMENGOU, L., VIU, J., RODRÍGUEZ-POZO, M. L., CESARINI, C., JOSE-CUNILLERAS, E. Parallel testing of plasma iron and fibrinogen concentrations to detect systemic inflammation in hospitalized horses. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 24, n. 4, p. 414-420, 2014.

COSTA, M. C.; SILVA, G.; RAMOS, R. V.; STAEMPFLI, H. R.; ARROYO, L. G.; KIM, P.; WEESE, J. S. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. **The Veterinary Journal**, v. 205, p. 74-80, 2015.

CORREA, G. F., NASCIMENTO, O. C. A., MOTA, T. P., HESPANHOLO, G. O., MOREIRA, C. G., MENEZES, M. L., VERVUERT, I., BALIEIRO, J. C. C., BUENO, I. C. S., BRANDI, R. A. Impact on digestibility, and blood and fecal parameters of replacing wheat bran with corn gluten meal in concentrate of adult horses. **Livestock Science**, v. 186, p. 41-45, 2016.

DALY, K.; PROUDMAN, C. J., DUNCAN, S. H., FLINT, H. J., DYER, J., SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. 989–995, 2012.

DE OLIVEIRA RAMALHO, L., CAIADO, J. C. C., DE SOUZA, V. R. C., COELHO, C. S. Glicemia e concentrações séricas de insulina, triglicérides e cortisol em equinos da raça quarto de milha e mestiços usados em provas de laço em dupla. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 318-324, 2012.

DESTREZ, A., GRIMM, P., CÉZILLY, F., JULLIAND, V. Changes of the hindgut microbiota due to high-starch diet can be associated with behavioral stress response in horses. **Physiology & behavior**, v. 149, p. 159-164, 2015.

DESTREZ, A., GRIMM, P., JULLIAND, V. Dietary-induced modulation of the hindgut microbiota is related to behavioral responses during stressful events in horses. **Physiology & behavior**, v. 202, p. 94-100, 2019.

DITTRICH, J. R., MELO, H. A., AFONSO, A. M. C. F., DITTRICH, R. L. Comportamento ingestivo de equinos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p.130-137 (supl. especial), 2010.

DONOHUE, D. R., GARGE, N., ZHANG, X., SUN, W., O'CONNELL, T. M., BUNGER, M. K., BULTMAN, S. J. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. **Cell Metab**, v. 13, p. 517–526, 2011.

DOUGAL, K.; HARRIS, P. A.; EDWARDS, A.; PACHEBAT, J. A.; BLACKMORE, T. M.; WORGAN, H. J.; NEWBOLD, J. A comparison of the microbiome and metabolome of diferente regions of the equine hindgut. **Federation of European Microbiological Societes**, v. 82, p. 642-652, 2012.

DRISSI, F., BUFFET, S., RAOULT, D., MERHEJ, V. Common occurrence of antibacterial agents in human intestinal microbiota. **Front. Microbiol.**, v. 6, n. 441, p. 1-8, 2015.

DUGDALE, A. H. A., CURTIS, G. C., CRIPPS, P. J., HARRIS, P. A., ARGO, C. M. Effects of season and body condition on appetite, body mass and body composition in ad libitum fed pony mares. **The Veterinary Journal**, v. 190, p. 329-337, 2011.

DVORAK, Z., KUBAN, V., KLEJDUS, B. Quaternary Benzo[c]phenanthridines Sanguinarine and Chelerythrine: a Review of Investigations from Chemical and Biological Studies. **Heterocycles**, v. 68, p. 2403-2422, 2006.

DVORÁK, Z., SIMÁNEK, V. Metabolism of Sanguinarine: The Facts and The Myths. **Current Drug Metabolism**, v. 8, p. 173-176, 2007.

DYER, J., MEREDIZ, E. F. C., SALMON, K. S. H., PROUDMAN, C. J., EDWARDS, G. B., SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Molecular characterisation of carbohydrate digestion and absorption in equine small intestine. **Equine veterinary journal**, v. 34, n. 4, p. 349-358, 2002.

DYER, J., AL-RAMMAHI, M., WATERFALL, L., SALMON, K. S., GEOR, R. J., BOURÉ, L., EDWARDS, G. B., PROUDMAN, C. J. SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Adaptive response of equine intestinal Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) to an increase in dietary soluble carbohydrate. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 458, n. 2, p. 419-430, 2009.

ENGEL, P. A., DODIYA, H. B., NAQIB, A., FORSYTH, C. B., GREEN, S. J., VOIGT, R. M., KORDOWER, J. H., MUTLU, E. A., SHANNON, K. M. KESHAVARZIAN, A. The potential role of gut-derived inflammation in multiple system atrophy. **Journal of Parkinson's disease**, v. 7, n. 2, p. 331-346, 2017.

ERICSSON, A. C.; JOHNSON, P. J.; LOPES, M. A.; PERRY, S. C.; LANTER, H. R. A Microbiological Map of the Healthy Equine Gastrointestinal Tract. **PLoS ONE**, v.11, n.11, p.1-17, 2016.

ESTRADA-ANGULO, A., AGUILAR-HERNÁNDEZ, A., OSUNA-PÉREZ, M., NÚÑEZ-BENÍTEZ, V. H., CASTRO-PÉREZ, B. I., SILVA-HIDALGO, G., CONTRERAS-PÉREZ, G., BARRERAS, A., PLASCENCIA, A., ZINN, R. A. Influence of quaternary benzophenanthridine and protopine alkaloids on growth performance, dietary energy, carcass traits, visceral mass, and rumen health in finishing ewes under conditions of severe temperature-humidity index. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 5, p. 652-658, 2016.

FAEHNRIKH, B., PASTOR, A., HEIDE, C., KRÖGER, S., ZENTEK, J. Effects of isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* on physiological, immunological and inflammatory parameters in healthy beagles: Alkaloids in dog nutrition. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 103, n. 2, p. 661-667, 2019.

FARLEY, E. B. **Digestion of protein in the equine small and large intestines**. Texas A&M University, Tese de Doutorado, 1995.

FELTRE, K. **Produção, utilização e comercialização de dieta completa peletizada ou extrusada para equinos**. Pirassununga, Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 2017.

FERNANDES, K. A.; KITTELMANN, S.; ROGERS, C. W.; GEE, E. K.; BOLWELL, C. F.; BERMINGHAM, E. N.; THOMAS, D. G. Faecal microbiota of forage-fed horses in

New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. **PloS One**, v.9:e112846, p.1-15, 2014.

FERREIRA, E. M., PIRES, A. V., SUSIN, I., BIEHL, M. V., GENTIL, R. S., PARENTE, M. D. O. M., POLIZEL, D. M., RIBEIRO, C. V. D. M., DE ALMEIDA, E. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 30-39, 2016.

FONNESBECK, P. V., LYDMAN, R. K., VANDER NOOT, G. W., SYMONS, L. D. Digestibility of the proximate nutrients of forages by horses. **J. Anim. Sci.**, v. 26, p. 1039–1044, 1967.

FRANK, N.; TADROS, E. M. Insulin dysregulation. **Equine veterinary journal**, v. 46, n. 1, p. 103-112, 2014.

FREEMAN, S. L. Diagnostic ultrasonography of the mature equine abdomen. **Equine vet. Educ.**, v. 15, n. 6, p. 319-330, 2003.

FREEMAN, D. E., MOONEY, A., GIGUÈRE, S., CLAIRE, J., EVETTS, C., DISKANT, P. Effect of feed deprivation on daily water consumption in healthy horses. **Equine Veterinary Journal**, p. 1-8, 2020.

FREIRE, R., CLEGG, H. A., BUCKLEY, P., FRIEND, M. A., MCGREEVY, P. D. The effects of two different amounts of dietary grain on the digestibility of the diet and behaviour of intensively managed horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 117, n. 1-2, p. 69-73, 2009.

GALADARI, S., RAHMAN, A., PALLICHANKANDY, S., THAYYULLATHIL, F. Molecular targets and anticancer potential of sanguinarine - a benzophenanthridine alkaloid. **Phytomedicine**, v. 34, p. 143–153, 2017.

GALVIN, N., DILLON, H., MCGOVERN, F. Right dorsal colitis in the horse: minireview and reports on three cases in Ireland. **Irish veterinary journal**, v. 57, n. 8, p. 467-473, 2004.

GARBER, A., HASTIE, P., MURRAY, J. A. Factors influencing equine gut microbiota: current knowledge. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 88, n. 102943, p. 1-12, 2020.

GEELLEN, S. N., VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M. S., BEYNEN, A. C. Dietary fat supplementation and equine plasma lipid metabolism. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, S30, p. 475-478, 1999.

GEELLEN, S., JANSEN, W., GEELLEN, M., SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M., & BEYNEN, A. Lipid metabolism in equines fed a fat-rich diet. **International journal for vitamin and nutrition research**, v. 70, n. 3, p. 148-152, 2000.

GEELLEN, S. N. J., VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, BEYNEN, A. C. Chapter 1 - Introduction. **Alternative Medicine Review**, S-76, 2001a.

GEELLEN, S. N., BLÁZQUEZ, C., GEELLEN, M. J., VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M. S., BEYNEN, A. C. High fat intake lowers hepatic fatty acid synthesis and raises fatty acid oxidation in aerobic muscle in Shetland ponies. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. 1, p. 31-36, 2001b.

GEOR, R. J. Metabolic predispositions to laminitis in horses and ponies: obesity, insulin resistance and metabolic syndromes. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 12, p. 753-759, 2008.

GIBBS, P. G., POTTER, G. D., SCHELLING, G. T., KREIDER, J. L., & BOYD, C. L. The significance of small vs large intestinal digestion of cereal grain and oilseed protein in the equine. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 16, n. 2, p. 60-65, 1996.

GIGUÈRE, S., PRESCOTT, J. F. Equine immunity to bacteria. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 16, n. 1, p. 29-47, 2000.

GOACHET, A. G., HARRIS, P., PHILIPPEAU, C., JULLIAND, V. Effect of physical training on nutrient digestibility and faecal fermentative parameters in Standardbred horses. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1081-1087, 2014.

GORDON, M. E., JERINA, M. L., KING, S. L., DAVISON, K. E., YOUNG, J. K., RAUB, R. H. The effects of nonstructural carbohydrate content and feeding rate on glucose and insulin response to meal feeding in equine. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 11, p. 489-493, 2007.

GRIMM, P., DE BARROS, J. P., JULLIAND, V. Impact of diet on bacterial lipopolysaccharides in equine feces and blood. **Livestock Science**, v. 215, p. 2-6, 2018.

HANSEN, N. C. K.; MYDLAND, L. T.; NÆSSET, J. A.; AUSTBØ, D.; MÅGE, I.; RUDI, K. Molecular diversity of the equine caecal microbiota and its correlation to postprandial fermentation metabolites: A preliminary approach, **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science**, v.63, n.4, p.208-216, 2013.

HANSEN, N. C. K.; AVERSHINA, E.; MYDLAND, L. T.; NÆSSET, J. A.; AUSTBØ, D.; MOEN, B.; MÅGE, I.; RUDI, K. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota, **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.26, n.1, 27216, 2015.

HARLOW, B. E., LAWRENCE, L. M., HAYES, S. H., CRUM, A., FLYTHE, M. D. Effect of Dietary Starch Source and Concentration on Equine Fecal Microbiota. **PLoS ONE**, v. 11, n.4, p. 1-21, 2016.

HARRIS, P., GEOR, R. J. Primer on dietary carbohydrates and utility of the glycemic index in equine nutrition. **Vet Clin Equine**, v. 25, p. 23–37, 2009.

HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., HAAN, S., HERMANN, H. M., MÜLLER-NEUEN, G., SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemical journal**, v. 374, n. 1, p. 1-20, 2003.

HENNEKE, D. R., POTTER, G. D., KREIDER, J. L., YEATES, B. F. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine veterinary journal**, v. 15, n. 4, p. 371-372, 1983.

HOFFMAN, R. M., BOSTON, R. C., STEFANOVSKI, D., KRONFELD, D. S., HARRIS, P. A. Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. **J. Anim. Sci.**, p. 2333-2342, 2003.

HOFFMAN, R. M. Carbohydrate metabolism and metabolic disorders in horses. **R. Bras. Zootec.**, v.38, p.270-276, 2009.

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

HOTHERSALL, B., NICOL, C. Role of diet and feeding in normal and stereotypic behaviors in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 25, n. 1, p. 167-181, 2009.

HUDA-FAUJAN, N., ABDULAMIR, A. S., FATIMAH, A. B., ANAS, O. M., SHUHAIMI, M., YAZID, A. M., LOONG, Y. Y. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. **The open biochemistry journal**, v. 4, p. 53-58, 2010.

IP, W. E., HOSHI, N., SHOUVAL, D. S., SNAPPER, S., MEDZHITOV, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513-519, 2017.

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

JACOBSEN, S. Review of equine acute-phase proteins. **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v. 53, p. 230-235, 2007.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 417p.1993.

JIANG, G., & ZHANG, B. B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 284, n. 4, p. E671-E678, 2003.

JOHNSON, A. C. B.; ROSSOW, H. A. Effects of two equine digestive aid supplements on hindgut health. **Translational Animal Science**, v. 3, n. 1, p. 340-349, 2019.

JONES, S. L., DAVIS, J., ROWLINGSON, K. Ultrasonographic findings in horses with right dorsal colitis: five cases (2000–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1248-1251, 2003.

JOUANY, J. P. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. **Sciences des Aliments**, 1982.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. Horse Species Symposium: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **Journal of Animal Science**, 2016.

JULLIAND, V., GRIMM, P. The impact of diet on the hindgut microbiome. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 23-28, 2017.

KALCK, K. A. Inflammatory bowel disease in horses. **Vet Clin Equine**, v. 25, p. 303–315, 2009.

KANE, E.; BAKER, J. P.; BULL, L. S. Utilization of a corn oil supplemented diet by the pony. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 1379-1384, 1979.

KOCH, S., NUSRAT, A. The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 35-60, 2012.

KRONFELD, D. S., HOLLAND, J. L., RICH, G. A., MEACHAM, T. N., FONTENOT, J. P., SKLAN, D. J., HARRIS, P. A. Fat digestibility in *Equus caballus* follows increasing first-order kinetics. **Journal of animal science**, v. 82, n. 6, p. 1773-1780, 2004.

KURATA, M., SUZUKI, M., AGAR, N. S. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 106B, n. 3, p. 477-487, 1993.

LACOB, S., LACOB, D. G. I. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. **Front. Microbiol.** v. 10, n. 1676, p. 1-17, 2019.

LIN, L., LIU, Y. C., HUANG, J. L., LIU, X. B., QING, Z. X., ZENG, J. G., & LIU, Z. Y. Medicinal plants of the genus *Macleaya* (*Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*): A review of their phytochemistry, pharmacology, and toxicology. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 1, p. 19-48, 2018.

MARCHELLO, E. V., SCHURG, W. A., MARCHELLO, J. A., CUNEO, S. P. Changes in lipoprotein composition in horses fed a fat-supplemented diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 20, n. 7, p. 453-458, 2000.

MARTIN, E. J.; REED, K. J.; KUNZ, I. G. Z.; COLEMAN, R. J.; COLEMAN, S. J. Normal variation and changes over time in the equine intestinal microbiome. Abstract. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 60, 2017.

MCGEACHY, M. J., BAK-JENSEN, K. S., CHEN, Y. I., TATO, C. M., BLUMENSCHNEIN, W., MCCLANAHAN, T., CUA, D. J. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. **Nature immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390-1397, 2007.

MCKENZIE, H. C. Equine hyperlipidemias. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 27, n. 1, p. 59-72, 2011.

MEDINA-TORRES, C. E. Colitis in the horse with a focus on right dorsal (RDUC). **AEV**, v. 2018, n. 2, p. 40-44, 2018.

MEGLASSON, M. D., & MATSCHINSKY, F. M. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. **Diabetes/metabolism reviews**, v. 2, n. 3-4, p. 163-214, 1986.

MERRIT, A. M. Normal equine gastroduodenal secretion and motility. **Equine Vet. J.**, Suppl. 29, p. 7-13, 1999.

MOORE, J. M., MELTON, T., CARTER, W. C., WRIGHT, A. L., SMITH, M. L. I: A New Look at Equine Gastrointestinal Anatomy, Function, and Selected Intestinal Displacements. **AAEP Proceedings**, v. 47, p. 53-60 2001.

MOREAU, M. M.; EADES, S. C.; REINEMEYER, C. R.; FUGARO, M. N.; ONISHI, J. C. Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse. **Veterinary Microbiology**, v. 168, p. 436-441, 2014.

MORRISON, P. K.; NEWBOLD, C. J.; JONES, E.; WORGAN, H. J.; GROVE-WHITE, D. H.; DUGDALE, A. H.; BARFOOT, C.; HARRIS, P. A.; ARGO, C. M. The Equine Gastrointestinal Microbiome: Impacts of Age and Obesity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-13, 2018.

MURA, E.; EDWARDS, J.; KITTELMANN, S.; KAERGER, K.; VOIGT, K.; MRÁZEK, J.; MONIELLO, G.; FLIEGEROVA, K. Anaerobic fungal communities differ along the horse digestive tract. **Fungal Biology**, v. 123, p. 240-246, 2019.

NAKA, T., NISHIMOTO, N., KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Research & Therapy**, v. 4, S3, p. 233-242, 2002.

NEDJADI, T., MORAN, A. W., AL-RAMMAHI, M. A., SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Characterization of butyrate transport across the luminal membranes of equine large intestine. **Experimental physiology**, v. 99, n. 10, p. 1335-1347, 2014.

NIU, X., FAN, T., LI, W., XING, W., HUANG, H. The anti-inflammatory effects of sanguinarine and its modulation of inflammatory mediators from peritoneal macrophages. **European journal of pharmacology**, v. 689, n. 1-3, p. 262-269, 2012.

NYMAN, S., DAHLBORN, K. Effect of water supply method and flow rate on drinking behavior and fluid balance in horses. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 1-2, p. 1-8, 2001.

ONISHI, J. C., PARK, J. W., PRADO, J., EADES, S. C., MIRZA, M. H., FUGARO, M. N., HÄGGBLÖM, M. M., REINEMEYER, C. R. Intestinal bacterial overgrowth includes potential pathogens in the carbohydrate overload models of equine acute laminitis. **Veterinary microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 354-363, 2012.

ORSINI, J., GALANTINO-HOMER, H., POLLITT, C. C. Laminitis in horses: through the lens of systems theory. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 2, p. 105-114, 2009.

OUYANG, W., RUTZ, S., CRELLIN, N. K., VALDEZ, P. A., HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 71-109, 2011.

PACKER, M., PATTERSON-KANE, J. C., SMITH, K. C., DURHAM, A. E. Quantification of Immune Cell Populations in the Lamina Propria of Equine Jejunal Biopsy Specimens. **J. Comp. Path.**, v. 132, p. 90-95, 2005.

PEREIRA, J. R. A.; ROSSI, P. Manual prático de avaliação nutricional de alimentos. FEALQ, 199-., 1995.

PERKINS, G. A.; DEN BAKKER, H. C.; BURTON, A. J.; ERB, H. N.; McDONOUGH, S. P.; McDONOUGH, P. L.; PARKER, J.; ROSENTHAL, R. L.; WIEDMANN, M.; DOWD, S. E.; SIMPSON, K. W. Equine Stomachs Harbor an Abundant and Diverse Mucosal Microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2522-2532, 2012.

PESSIN, J. E., & SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 2, p. 165-169, 2000.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

PIHL, T. H., SCHEEPERS, E., SANZ, M., GODDARD, A., PAGE, P., TOFT, N., ANDERSEN, P. H., JACOBSEN, S. Influence of disease process and duration on acute phase proteins in serum and peritoneal fluid of horses with colic. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 29, i. 2, p. 651-658, 2015.

PRATT-PHILLIPS, S., KUTZNER-MULLIGAN, J., MARVIN, R., BROWN, H., SYKES, C., FEDERICO, J. The Effect of Feeding Two or Three Meals Per Day of Either Low or High Nonstructural Carbohydrate Concentrates on Postprandial Glucose and Insulin Concentrations in Horses. **Journal of equine veterinary science**, v. 34, n. 11-12, p. 1251-1256, 2014.

PRYCE, J. D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, n. 1125, p. 1151-1152, 1969.

RICART-JANÉ, D., RODRÍGUEZ-SUREDA, V., BENAVIDES, A., PEINADO-ONSURBE, J., LÓPEZ-TEJERO, M. D., LLOBERA, M. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. **Metabolism**, v. 51, p. 925-931, 2002.

RICART-JANÉ, D., CEJUDO-MARTÍN, P., PEINADO-ONSURBE, J., LÓPEZ-TEJERO, M. D., LLOBERA, M. Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress. **Journal of applied physiology**, v. 99, n. 4, p. 1343-1351, 2005.

RICHARDS, N., CHOCT, M., HINCH, G. N., ROWE, J. B. Equine α -amylase: does it limit starch digestion in the small intestine of the horse. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, v. 14, p. 191-196, 2003.

RIJNEN, K. E., VAN DER KOLK, J. H. Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies. **American journal of veterinary research**, v. 64, n. 10, p. 1260-1264, 2003.

ROTH-WALTER, F., BERGER, S., LUCKSCHANDER-ZELLER, N. Inflammatory bowel disease in humans, pets, and horses. In: JENSEN-JAROLIM, E. **Comparative Medicine**. Springer, Cham, p. 47-69, 2017.

RUIJTER, J. M., RAMAKERS, C., HOOGAARS, W. M. H., KARLEN, Y., BAKKER, O., VAN DEN HOFF, M. J. B., MOORMAN, A. F. M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 6, p. 45-e45, 2009.

SANTOS, A. S., RODRIGUES, M. A. M., BESSA, R. J. B., FERREIRA, L. M., MARTIN-ROSSET, W. Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. **Animal**, v. 5, n. 1, p. 48-56, 2011.

SHAWAF, T., HUSSEN, J., AL-ZOUBI, M., HAMAASH, H., AL-BUSADAH, K. Impact of season, age and gender on some clinical, haematological and serum parameters in Shetland ponies in east province, Saudi Arabia. **International journal of veterinary science and medicine**, v. 6, n. 1, p. 61-64, 2018.

SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Molecular insights into dietary induced colic in the horse. **Equine vet. J.**, v. 40, n. 4, p. 414-421, 2008.

SILVA, V. P.; ALMEIDA, F. Q.; MORGADO, E. S.; FRANÇA, A. B.; VENTURA, H. T.; RODRIGUES, L. M., Digestibilidade dos nutrientes de alimentos volumosos determinada pela técnica dos sacos móveis em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 1, p. 82-89, 2009.

SIWINSKA, N., ZAK, A., BARON, M., CYLNA, M., BOROWICZ, H. Right dorsal colon ultrasonography in normal adult ponies and miniature horses. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, e0186825, 2017.

SPONCHIADO, M., GOMES, N. S., FONTES, P. K., MARTINS, T., DEL COLLADO, M., PASTORE, A. D. A., PUGLIESI, G., NOGUEIRA, M. F. G., BINELLI, M. Pre-hatching embryo-dependent and-independent programming of endometrial function in cattle. **PloS one**, v. 12, n. 4, e0175954, 2017.

STARZONEK, J., ROSCHER, K., BLÜHER, M., BLAUE, D., SCHEDLBAUER, C., HIRZ, M., RAILA, J., VERVUERT, I. Effects of a blend of green tea and curcuma extract supplementation on lipopolysaccharide-induced inflammation in horses and ponies. **PeerJ**, v. 7, e8053, p. 1-17, 2019.

STEWART, A. S., PRATT-PHILLIPS, S., GONZALEZ, L. M. Alterations in intestinal permeability: the role of the "leaky gut" in health and disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 10-22, 2017.

STEWART-HUNT, L., PRATT-PHILLIPS, S., MCCUTCHEON, L. J., GEOR, R. J. Dietary energy source and physical conditioning affect insulin sensitivity and skeletal muscle glucose metabolism in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 355-360, 2010.

STOCKHAM, S. L. Interpretation of equine serum biochemical profile results. **Veterinary clinics of North America: equine practice**, v. 11, n. 3, p. 391-414, 1995.

STULL, C. L., RODIEK, A. V. Responses of blood glucose, insulin and cortisol concentrations to common equine diets. **The Journal of nutrition**, v. 118, n. 2, p. 206-213, 1988.

STURGEON, L. S., BAKER, L. A., PIPKIN, J. L., HALIBURTON, J. C., CHIRASE, N. K. The digestibility and mineral availability of Matua, Bermuda grass, and alfalfa hay in mature horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 20, n. 1, p. 45-48, 2000.

SWYERS, K. L., BURK, A. O., HARTSOCK, T. G., UNGERFELD, E. M., SHELTON, J. L. Effects of direct-fed microbial supplementation on digestibility and fermentation end-products in horses fed low-and high-starch concentrates. **Journal of animal science**, v. 86, n. 10, p. 2596-2608, 2008.

TANAKA, T., NARAZAKI, M., KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 10, a016295, p. 1-17, 2014.

TORRE, U. D. L.; HENDERSON, J. D.; FURTADO, K. L.; PEDROJA, M.; ELENAMARIE, O.; MORA, A.; PECHANEC, M. Y.; MAGA, E. A.; MIENALTOWSKI, M. J. Utilizing the fecal microbiota to understand foal gut transitions from birth to weaning. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1-18, 2019.

TREIBER, K. H., BOSTON, R. C., KRONFELD, D. S., STANIAR, W. B., HARRIS, P. A. Insulin resistance and compensation in Thoroughbred weanlings adapted to high-glycemic meals. **Journal of animal science**, v. 83, n. 10, p. 2357-2364, 2005.

TYLER, R. D., COWELL, R. L., CLINKENBEARD, K. D., MACALLISTER, C. G. Hematologic values in horses and interpretation of hematologic data. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 3, n. 3, p. 461-484, 1987.

VAN DEN BERG, M., HOSKIN, S. O., ROGERS, C. W., GRINBERG, A. Fecal pH and microbial populations in thoroughbred horses during transition from pasture to concentrate feeding. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 4, p. 215-222, 2013.

VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J. B., LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VENABLE, E., FENTON, K., BRANER, V., REDDINGTON, C., HALPIN, M., HEITZ, S., FRANCIS, J., GULSON, N., GOYER, C., BLAND, S., LIU, T. W., HOLSCHEER, H. D., SWANSON, K. S. Effects of feeding management on the equine cecal microbiota, **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 49, p. 113-121, 2017.

VENDRIG, J. C., FINK-GREMMEIS, J. Intestinal barrier function in neonatal foals: Options for improvement. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 32-37, 2012.

VIANA, F. A. B. **Guia terapêutico veterinário**. 2 ed., p. 339 CEM: Belo Horizonte, Brasil, 2007.

VRUBLOVA, E., VOSTALOVA, J., EHRMANN, J., PALIKOVA, I., VRBKOVA, J., VACEK, J., CIBICEK, N., VECERA, R., ULRICHOVA, J., SIMANEK, V. The phytogetic feed additive Sangrovit modulates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 12, p. 610–618, 2010.

WALLER, A. P., HUETTNER, L., KOHLER, K., LACOMBE, V. A. Novel link between inflammation and impaired glucose transport during equine insulin resistance. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 149, p. 208-215, 2012.

WANG, Q., DAI, P., BAO, H., LIANG, P., WANG, W., XING, A., SUN, J. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of sanguinarine following cerebral ischemia in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, p. 263-268, 2017.

WEESE, J. S. Probiotics. prebiotics and synbiotics. **Journal Equine Veterinary Science**. v. 22, n. 8, p. 357-360, 2002.

WILLING, B.; VÖRÖS, A.; ROOS, S.; JONES, C.; JANSSON, A.; LINGBERG, J. E. Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. **Equine vet. J.**, v. 41, n. 9, p. 908-914, 2009.

WILMINK, J. M., VEENMAN, J. N., VAN DEN BOOM, R., RUTTEN, V. P. M. G., NIEWOLD, T. A., BROEKHUISEN-DAVIES, J. M., LEES, P., ARMSTRONG, S., VAN WEEREN, P. R., BARNEVELD, A. Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies. **Equine veterinary journal**, v. 35, n. 6, p. 561-569, 2003.

YEN, D., CHEUNG, J., SCHEERENS, H., POULET, F., MCCLANAHAN, T., MCKENZIE, B., KLEINSCHKE, M. A., OWYANG, A., MATTSON, J., BLUMENSCHIN, W., MURPHY, E., SATHE, M., CUA, D. J., KASTELEIN, R. A., RENNICK, D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 5, p. 1310-1316, 2006.

ZEYNER, A., GEIßLER, C., DITTRICH, A. Effects of hay intake and feeding sequence on variables in faeces and faecal water (dry matter, pH value, organic acids, ammonia, buffering capacity) of horses. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 88, n. 1-2, p. 7-19, 2004.

**APÊNDICE A – PARÂMETROS SANGUÍNEOS DOS PÔNEIS UTILIZADOS ANTES DO INÍCIO DA PRIMEIRA FASE
EXPERIMENTAL**

HEMOGRAMA E LEUCOGRAMA																
ANIMAL	HEM	HB	HT	VCM	HCM	CHCM	PLAQ.	PROT. PLASM.	FIBRIN.	LEUC.	NEUT. SEG.	NEUT. BAST.	LINF.	MON.	EOSIN.	BASÓF.
Dunga	8,98	15,9	46,1	51,4	17,7	34,4	165000	7,2	200	6100	3172	0	2623	61	244	0
Dengoso	7,47	14,2	41,6	55,8	19	34,1	210000	7,4	200	8700	3393	0	5046	87	174	0
Feliz	8,62	15,3	44,9	52,1	17,7	34	167000	6,8	200	7800	4056	0	3042	78	390	234
Zangado	9,02	14,5	48,2	53,5	16	30	221000	7,8	400	6700	2680	0	3149	469	335	67
Atchim	9,96	17,4	51,9	52,2	17,4	33,5	204.000	7,6	200	7600	3116	0	4332	152	0	0
Branco	7,62	13,4	39,2	51,5	17,5	34,1	173.000	7,2	200	9200	3312	0	5336	368	184	0
Soneca	6,56	11,4	33,3	50,9	17,3	34,2	198.000	7,8	400	4500	2205	0	1935	45	225	90
Mestre	7,16	13,9	40,3	56,3	19,4	34,4	179.000	7,4	200	7100	2485	0	4260	71	284	0
BIOQUÍMICA																
ANIMAL	URÉIA	CREATININA		AST	GGT	PROTEÍNA TOTAL	ALBUMINA	GLOBULINA	BILIRRUBINA TOTAL	BILIRRUBINA DIRETA	BILIRRUBINA INDIRETA					
Dunga	35,3	1,13		303	28	7,29	3,36	3,93	0,51	0,29	0,22					
Dengoso	29,4	1,07		372	38	7,09	3,4	3,69	0,39	0,23	0,16					
Feliz	30,9	1,25		287	30	6,35	3,01	3,34	0,64	0,36	0,28					
Zangado	34,2	1,37		276	14	6,84	3,17	3,67	0,55	0,28	0,27					
Atchim	35,6	1,29		244	15	6,95	3,06	3,89	0,44	0,29	0,15					
Branco	35,9	1,01		371	155	6,99	2,78	4,21	0,61	0,29	0,32					
Soneca	35,6	1,06		206	14	7,09	3,01	4,08	0,41	0,23	0,18					
Mestre	38,3	1,28		280	18	6,81	3,19	3,62	0,53	0,27	0,26					

ANEXO A – NÚCLEO EQUINO UTILIZADO NA RAÇÃO

Produto: Núcleo equino - Agromix® (Jaboticabal, São Paulo, Brasil)

Composição básica: carbonato de cálcio, cloreto de sódio (sal comum), enxofre ventilado (flor de enxofre), fosfato bicalcico, iodato de cálcio, levedura inativada, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco.

Níveis de garantia:

Cálcio (Mínimo)	190,00 g/Kg
Cálcio (Máximo)	215,00 g/kg
Cloro (Mínimo)	105,00 g/kg
Cobalto (Mínimo)	12,00 mg/kg
Cobre (Mínimo)	250,00 mg/kg
Enxofre (Mínimo)	2,00 g/kg
Ferro (Mínimo)	1.000,00 mg/kg
Fluor (Máximo)	720,00 mg/kg
Fosforo (Mínimo)	72,00 g/kg
Iodo (Mínimo)	20,00 mg/kg
Magnésio (Mínimo)	28,00 g/kg
Manganês (Mínimo)	1.000,00 mg/kg
Selênio (Mínimo)	2,00 mg/kg
Sódio (Mínimo)	68,00 g/kg
Zinco (Mínimo)	1500,00 mg/kg