

ALEXANDRE MONTEIRO BARBOSA

**Efeitos da Síndrome Metabólica Equina na diminuição da função endometrial e no perfil oxidativo sérico**

São Paulo

2022

ALEXANDRE MONTEIRO BARBOSA

**Efeitos da Síndrome Metabólica Equina na diminuição da função endometrial e no perfil oxidativo sérico**

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

**Departamento:**  
Reprodução Animal (VRA)

**Área de concentração:**  
Reprodução Animal

**Orientador:**  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia Barbosa Fernandes

São Paulo  
2022

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

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4179  
FMVZ

Barbosa, Alexandre Monteiro  
Efeitos da Síndrome Metabólica Equina na diminuição da função endometrial e no perfil oxidativo sérico / Alexandre Monteiro Barbosa. – 2022.  
40 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Barbosa Fernandes.

1. Obesidade. 2. RISQI. 3. MIRG. 4. Hiperinsulinemia. 5. Equino. I. Título.

# PARECER CIRCUNSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA SÍNDROME METABÓLICA EQUINA NA DIMINUIÇÃO DA FUNÇÃO ENDOMETRIAL E NO PERFIL OXIDATIVO SÉRICO", protocolada sob o CEUA nº 1325241018 (ID 006673), sob a responsabilidade de **Cláudia Barbosa Fernandes e equipe; Alexandre Monteiro Barbosa** - 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 19/06/2019.

We certify that the proposal "EFFECTS OF EQUINE METABOLIC SYNDROME ON DECREASED ENDOMETRIAL FUNCTION AND SERUM OXIDATIVE PROFILE", utilizing 20 Equines (20 females), protocol number CEUA 1325241018 (ID 006673), under the responsibility of **Cláudia Barbosa Fernandes and team; Alexandre Monteiro Barbosa** - 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 06/19/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2018** a **12/2019**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **3 a 15 anos**

N: **20**

Linhagem: **PSL e BH**

Peso: **300 a 650 kg**

Local do experimento: Fazenda Anhembi - Estrada do Apotribu s/ numero - Itu, SP

São Paulo, 26 de maio de 2022

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-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

AUTOR: BARBOSA, Alexandre Monteiro

Título: **Efeitos da Síndrome Metabólica Equina na diminuição da função endometrial e no perfil oxidativo sérico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução 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: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades a mim concedidas e pela força durante esse período. Aos meus pais (Américo Rodrigues Barbosa e Marilene Mendes Monteiro Barbosa) e aos meus irmãos (Américo Monteiro Barbosa e Felipe Monteiro Barbosa) por todo o suporte nas decisões que me trouxeram até aqui.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Cláudia Barbosa Fernandes pelo incentivo desde antes da minha entrada no programa, pelo guia e por toda a paciência que teve sempre que possível durante os quatro anos de duração desse trabalho. Agradeço à Dra. Fernanda Jordão Affonso também pelo incentivo e apoio que me levou à conclusão do mestrado. A todo o corpo docente, docente e funcionários do programa de pós-graduação em reprodução animal e em especial meus colegas do LEPPE por cada palavra e detalhe que levo para a vida, além da força e suporte sempre que foi necessário.

Obrigado aos proprietários e criadores que disponibilizaram seus animais para a realização deste trabalho, Roberto Pedrosa, do Haras do Drosa, Fernando e sua filha Carol Rodrigues, do Arena Lusitano e à Dra. Maria Augusta Alonso, da Fazenda Santa Rita II à quem também devo agradecer muito por toda ajuda dada no delineamento do trabalho. Obrigado também à todos os colaboradores e funcionário das fazendas que me ajudaram demais no dia a dia das coletas e sem eles não seria possível, em especial Mari, Iza e Fabinho da Fazenda Santa Rita II que foram essenciais.

Aos vários colegas que me ajudaram nas coletas e análises, obrigado! Jade Rohof, uma amiga que o mestrado me trouxe e que tem um espaço no meu coração e uma amiga que levarei para a vida, muito obrigado pela ajuda nas coletas, amostragens e análises e obrigado por ser essa parceira para todos os momentos. Aos meus amigos Luís Ruas e Pedro Maia, que acompanharam todo o processo e por muitas vezes me ajudaram de diversas formas. À Fernanda Andrade, pela ajuda e incentivo na reta final. À minha namorada Carolina Tiekó, por estar do meu lado nos melhores e piores momentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Obrigado à CAPES pela concessão da bolsa.

Por fim, agradeço aos cavalos, animal que tem o meu coração e que me trouxe até aqui com desejo de estudá-lo sempre para buscar o seu melhor estar. Em especial, muito obrigado às éguas que participaram deste trabalho, em prol da pesquisa.

## RESUMO

BARBOSA, A. M. **Efeitos da Síndrome Metabólica Equina na diminuição da função endometrial e no perfil oxidativo sérico.** 2022. 40f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a severidade e distribuição da inflamação e fibrose no endométrio de éguas com síndrome metabólica equina (SME) através do escore de Kenney, que estipula a chance do endométrio em conceber e manter uma gestação, e compará-los com éguas do grupo controle, sem a SME, seis dias após a ovulação (D6), além de avaliar o perfil oxidativo sérico por meio da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPX), da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e do Óxido Nítrico nas amostras de sangue coletadas durante o estro, com folículo  $\geq 35\text{mm}$  e edema uterino, e durante o diestro, seis dias após a ovulação, também comparando os grupos de éguas com e sem SME. Foram utilizadas 10 éguas da raça Mangalarga Paulista entre 8 e 17 anos de idade em regime à pasto com suplementação com concentrado de manutenção. As éguas foram classificadas em dois grupos, SME e CON, de acordo com os índices de resistência à insulina RISQI e MIRG. Três éguas não apresentaram os índices necessários para classificação dos grupos e foram descartadas. O escore de Kenney é determinado de acordo com a avaliação histopatológica do tecido endometrial, onde é avaliado grau e distribuição de fibrose, células inflamatórias e linfangiectasia. Essas variáveis foram estudadas individualmente e não foi observado diferença estatística entre os grupos. Ambos os grupos mostraram resultados semelhantes para o escore de Kenney ( $P=1$ ), sendo que todas as amostras apresentaram grau I ou IIA, indicando que todas as éguas possuem até 80% de chance de manter uma gestação. Não foi observado fibrose nas amostras do grupo CON, enquanto no grupo SME foi possível encontrar fibrose ausente, branda, mínima ou moderada porém, não foi possível encontrar diferença estatística entre os grupos para a variável fibrose ( $P=0,292$ ). Quanto à inflamação endometrial, metade do grupo CON apresentou inflamação mínima enquanto 80% do grupo SME apresentou inflamação branda ou mínima, também não apresentando diferença estatística ( $p=0,526$ ). A linfangiectasia foi observada em todas as éguas do grupo CON e não foi observada no grupo SME. Mesmo assim, apesar de se aproximar bastante, não houve diferença estatística ( $p=0,058$ ). A discrepante diferença nos números amostrais dos grupos estudados é, provavelmente, a causa de não encontrarmos diferenças estatísticas mesmo quando houve grande diferenças numéricas, como nos casos da fibrose

e linfangiectasia. Em relação ao perfil oxidativo, o grupo SME mostrou maior atividade de GPx durante o estro ( $p=0,044$ ), sugerindo maior necessidade de ação antioxidante durante o estro de éguas com Síndrome Metabólica Equina. Durante o diestro (D6) a atividade da SOD não mostrou diferença estatística, apesar de chegar próximo ( $p=0,082$ ). Apesar de ambas as enzimas SOD e GPx praticarem a mesma função antioxidante, foi visto que sua atividade esteve maior em diferentes momentos no grupo SME. As concentrações de TBARS e Óxido Nítrico não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos nos diferentes momentos. Não foi possível relacionar a SME com o estresse oxidativo neste estudo, já que não houve desbalanço dos agentes oxidantes e anti-oxidantes. Apesar das éguas com SME terem apresentado um desafio oxidante no estro, o sistema antioxidante se demonstrou capaz de se proteger de danos oxidativo, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes GPx.

Palavras-chave: Obesidade. RISQI. MIRG. Hiperinsulinemia. Equino



## ABSTRACT

BARBOSA, A. M. **Effects of Equine Metabolic Syndrome on decreased endometrial function and serum oxidative profile.** 2022. 40f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The goals of this study were to evaluate the severity and distribution of inflammation and fibrosis in the endometrium of mares with equine metabolic syndrome (EMS) using the Kenney score, which stipulates the endometrium's chance of conceiving and maintaining a pregnancy, and comparing them with mares of the control group, without SME, six days after ovulation (D6), in addition to evaluating the serum oxidative profile through the activity of the enzymes Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GPX), the concentration of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) and Nitric Oxide in blood samples collected during estrus, with follicle  $\geq 35$ mm and uterine edema, and during diestrus, six days after ovulation, also comparing groups of mares with and without EMS. Ten Mangalarga Paulista mares between 8 and 17 years of age were used on pasture with supplementation with maintenance concentrate. The mares were classified into two groups, SME and CON, according to the RISQI and MIRG insulin resistance indices. Three mares did not present the necessary indices to classify the groups and were discarded. The Kenney score is determined according to the histopathological evaluation of the endometrial tissue, where the degree and distribution of fibrosis, inflammatory cells and lymphangiectasia are evaluated. These variables were studied individually, and no statistical difference was observed between the groups. Both groups showed similar results for the Kenney score ( $P=1$ ), with all samples presenting grade I or IIA, indicating that all mares have up to an 80% chance of maintaining a pregnancy. No fibrosis was observed in the samples of the CON group, while in the SME group it was possible to find absent, mild, minimal or moderate fibrosis, however, it was not possible to find a statistical difference between the groups for the variable fibrosis ( $P=0.292$ ). As for endometrial inflammation, half of the CON group had minimal inflammation while 80% of the SME group had mild or minimal inflammation, also showing no statistical difference ( $p=0.526$ ). Lymphangiectasia was observed in all mares in the CON group and was not observed in the SME group. Even so, despite being very close, there was no statistical difference ( $p=0.058$ ). The discrepant difference in the sample numbers of the groups studied is probably the reason why we did not find statistical differences even when there were large numerical differences, as in the

cases of fibrosis and lymphangiectasia. Regarding the oxidative profile, the SME group showed higher GPx activity during estrus ( $p=0.044$ ), suggesting a greater need for antioxidant action during estrus in mares with Equine Metabolic Syndrome. During diestrus (D6) SOD activity did not show statistical difference, despite getting close ( $p=0.082$ ). Although both SOD and GPx enzymes perform the same antioxidant function, it was seen that their activity was higher at different times in the SME group. The concentrations of TBARS and Nitric Oxide did not show statistical differences between the groups at different times. It was not possible to relate SME to oxidative stress in this study, since there was no imbalance between oxidizing and antioxidant agents. Although mares with SME presented an oxidative challenge in estrus, the antioxidant system was able to protect itself from oxidative damage, increasing the activity of GPx antioxidant enzymes.

Keywords: Obesity. RISQI. MIRG. Hyperinsulinemia. Equine

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Classificação dos animais nos grupos estudados (SME e CON) e animais descartados do experimento de acordo com os índices RISQI e MIRG. .... 27
- Tabela 2 - Frequência das classificações das variáveis escore de Kenney, Fibrose, Inflamação e Linfangiectasia entre os grupos SME e CON e o valor P entre os grupos. . 28
- Tabela 3 - Média  $\pm$  desvio padrão da atividade da SOD, atividade da GPx, concentração das TBARS, concentração do Óxido Nítrico entre os grupos..... 32

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de barras relacionando a variável Escore Kenney entre os grupos SME e CON.....	29
Gráfico 2 - Gráfico de barras relacionando a incidência dos diferentes graus de Fibrose entre grupos SME e CON.....	30
Gráfico 3 - Gráfico de barras relacionando a incidência dos diferentes graus de Inflamação entre os grupos SME e CON.....	30
Gráfico 4 - Gráfico de barras relacionando os graus de Linfangiectasia entre os grupos SME e CON.....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental. Momentos das coletas de dados e amostras do trabalho. .....	23
Figura 2 – Finos cortes de tecido endometrial em lâminas de vidro, corados em eosina e hematoxilina.....	24
Figura 3 – Cortes histológicos de tecido endometrial de éguas corados em Eosina e Hematoxilina e classificados com escore I e IIA de acordo com o grau e a distribuição da inflamação e fibrose.....	29

## SÚMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 Impacto da Síndrome Metabólica Equina nas funções reprodutivas .....	17
2.2 Perfil Oxidativo .....	19
2.3 Análise histológica da inflamação endometrial .....	20
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	<b>22</b>
<b>4 OBJETIVO</b> .....	<b>22</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
5.1 Classificação dos grupos .....	22
5.2 Avaliação do trato reprodutivo .....	23
5.3 Biópsias endometriais .....	24
5.4 Análises histológicas .....	24
5.5 Estabelecimento do perfil oxidativo .....	26
5.6 Análise estatística .....	27
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
6.1 Classificação dos grupos .....	27
6.2 Histologia endometrial .....	28
6.3 Perfil oxidativo .....	32
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Síndrome Metabólica Equina (SME) é uma importante desordem endócrina e talvez uma das mais sub-diagnosticadas na espécie equina, tendo sua expressão como resultado de uma interação complexa entre genética e ambiente (DURHAM et al., 2019). Suas principais manifestações são: resistência à insulina, acúmulo regional de tecido adiposo, obesidade e predisposição à laminite (FRANK, 2011).

A obesidade tem sido assunto de grande preocupação para o bem-estar animal e está associada ao crescimento da morbidade e mortalidade dos equinos (GEOR, 2008; OWERS e CHUBBOCK, 2013). A melhora da qualidade da pastagem e a manutenção da qualidade nutricional durante as estações do ano são importantes agravantes desta condição, que já se tornou uma epidemia (SILLENCE, 2012; OWERS e CHUBBOCK, 2013). Entretanto, a adiposidade não está intrinsecamente ligada a resistência insulínica, e é possível um cavalo magro ter SME ou apresentar depósitos de gorduras sem nenhuma dessas alterações (DURHAM et al., 2019), podendo existir ainda a possibilidade de alguns equinos afetados apresentarem condição corporal magra, mas com adiposidade regional, como a crista do pescoço (CARTER et al., 2009). Bamford e colegas concluíram que não é a obesidade por si só que leva a resistência insulínica, mas sim a dieta pela qual esses cavalos tiveram para aumentar seu escore de condição corporal (ECC). Quando pôneis e cavalos receberam uma dieta calórica com alto teor de gordura e baixo teor de carboidratos não estruturais, a sensibilidade à insulina não mudou comparado a animais com ECC normal, contudo, quando esses mesmos animais receberam uma dieta com o mesmo valor calórico, mas rica em amido eles se tornaram muito mais resistentes à insulina (BAMFORD et al., 2016).

Além das manifestações principais, outras podem ser atribuídas à SME, entre elas estão hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensão, alteração nas concentrações de proteínas secretadas pelo tecido adiposo (adipocinas), como a leptina, adiponectina e citocinas pró-inflamatórias, além de mudança na ciclicidade reprodutiva e infertilidade nas fêmeas equinas (BURNS, 2016). Não se sabe ao certo como a hiperinsulinemia e a resistência à insulina afetam as atividades reprodutivas nos equinos. Porém, a pesquisa de Vick et al. (2006) apontou que a hiperinsulinemia e/ou a resistência à insulina em equinos afetam diretamente a atividade ovariana sem afetar o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Os mesmos autores demonstraram que éguas com resistência à insulina induzida, não mostraram diferença na pulsatilidade de LH e nos níveis de FSH, hormônios secretados pela hipófise anterior (VICK et al., 2006).

Pesquisadores relataram a resistência à insulina como peça chave da subfertilidade relacionada à obesidade em mulheres. A insulina é capaz de se ligar a receptores de IGF-1 como se fossem seus próprios receptores e diminuir a produção de IGFBP-1, o que torna a IGF-1 mais eficaz. A IGF-1 também estimula a produção de andrógenos nas células da teca intersticiais e estromais. A hiperandrogenemia leva as células da granulosa a sofrerem apoptose, acarretando em perda de função (ÖZCAN DAĞ E DILBAZ, 2015). Ainda em seres humanos, é bem estabelecido que o risco de abortamento ou perda embrionária é aumentado em indivíduos obesos e a presença de desordens metabólicas como a Síndrome do Ovário Policístico (SOP) agrava ainda mais essa situação. Porém, não está definido se a causa desse problema é embrionária, endometrial ou ambas (ÖZCAN DAĞ E DILBAZ, 2015). Lopes et al (2011) apresentam a receptividade endometrial durante a janela de implantação como fator limitante nas taxas de gestação em pacientes com doenças como a SOP.

Apesar da insulina ter sido considerada potencial sinalizadora do reconhecimento materno de gestação nos equinos, os experimentos de Rambags et al (2008) demonstraram que a administração de insulina exógena não alterou o tamanho do corpo lúteo, o período do diestro, o intervalo entre ovulações ou as concentrações de LH e também não foi encontrada a presença de insulina no saco vitelínico de embriões equinos de 10 a 14 dias, deixando dúvidas sobre o papel da insulina no reconhecimento materno de gestação.

Além da insulina, o acúmulo de tecido adiposo pode ser chave para a perda de função endometrial. Os adipócitos são células responsáveis pela síntese e secreção das adipocinas, que exercem importantes funções metabólicas e endocrinológicas (BURNS et al., 2010). A leptina é uma adipocina secretada principalmente pelo tecido adiposo e está diretamente relacionada com o acúmulo de massa gorda. A quantidade de energia estocada em tecido adiposo e as mudanças na ingestão de calorias afetam diretamente os níveis de leptina circulante (LICINO et al., 1997). As citocinas pró-inflamatórias exercem função importante na fase aguda de inflamação pós cobertura nas éguas (CHRISTOFFERSEN et al., 2012).

Ao contrário da maioria das outras adipocinas, a adiponectina tem seus níveis reduzidos nos indivíduos obesos (GIL-CAMPOS et al., 2004). A diminuição dos níveis de adiponectina prejudicará também o perfil inflamatório do indivíduo acometido, já que ela exerce função anti-inflamatória, enquanto as citocinas pró-inflamatórias exercem função importante na fase aguda de inflamação pós cobertura nas éguas (CHRISTOFFERSEN et al., 2012). O TNF $\alpha$  é uma das citocinas pró-inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo



que também possui efeito na inibição da ação da insulina na síntese do óxido nítrico, o que também contribui para o desequilíbrio oxidativo (KIM et al., 2001).

O acúmulo de tecido adiposo influenciará no desequilíbrio oxidativo prejudicando a irrigação das células, levando à hipóxia e necrose celular. Para eliminar as células mortas acontece um processo de fagocitose que resulta em liberação de radicais livres como o Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio, aumentando então os agentes oxidantes e levando ao desequilíbrio com os agentes antioxidantes. (FRANCISQUETI et al., 2017).

O desequilíbrio oxidativo leva a perda de função celular e tecidual além de contribuir para inflamação sistêmica e de diversos órgãos, inclusive do endométrio (SOFFLER, 2007). O aumento da produção de adipocinas inflamatórias, relacionado à hiperinsulinemia no caso das éguas com SME pode acarretar em maior inflamação sistêmica, possível alteração na função tecidual, aumento do grau de fibrose e prejudicar o reconhecimento materno, porém mais estudos são necessários para elucidar os efeitos da síndrome metabólica nas atividades reprodutivas das éguas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Impacto da Síndrome Metabólica nas funções reprodutivas**

Não é simples definir como as alterações metabólicas ligadas ao aumento da adiposidade afetam a atividade reprodutiva, uma vez que falamos de um mecanismo complexo e que depende de diversos fatores.

As mulheres apresentam uma síndrome metabólica parecida com a Síndrome Metabólica Equina, agravada pelo acúmulo de tecido adiposo. A SOP consiste na não ovulação, com menstruações irregulares, excesso de andrógenos, infertilidade, intolerância à glicose e dislipidemia (EHRMANN, 2005). Em pacientes com SOP também vemos aumento de citocinas pró-inflamatórias e diminuição das adipocinas anti-inflamatórias como a adiponectina (ÖZCAN DAĞ E DILBAZ, 2015).

Pesquisadores relataram a resistência à insulina como peça chave da subfertilidade relacionada à obesidade em mulheres. Isso se dá pelo excesso de andrógenos ocasionado pela hiperinsulinemia e resistência à insulina (EHRMANN, 2005).

A insulina juntamente com os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) têm ação modulatória dos hormônios tróficos, LH e ACTH, que, por sua vez, modulam a formação de andrógenos pelo ovário (BALEN, 2004). É necessária uma certa concentração de andrógenos nos ovários para que haja o crescimento folicular e a síntese de estradiol,

porém, o excesso de andrógenos ocasiona disfunções ovarianas, fazendo maturação irregular e atresia folicular (BALEN, 2004). Além disso, a IGF-1 tem sua ação potencializada pelo aumento da insulina que se liga aos receptores de IGF-1, diminuindo a produção da mesma e estimulando a produção de andrógenos nas células da teca. Esse aumento nos níveis de andrógenos leva células da granulosa a sofrerem apoptose, acarretando em perda de função (ÖZCAN DAĞ E DILBAZ, 2015).

Mulheres hiperinsulinêmicas apresentam níveis de estrógeno aumentados nos folículos em desenvolvimento, isso se dá em função de a produção de estradiol e progesterona ser mediada pelo FSH cujo efeito é potencializado pela ação da insulina. A esteroidogênese mediada pelo LH nas células da granulosa também é potencializada pela presença de insulina. O excesso de esteroides acarretado pela hiperinsulinemia resulta em um ambiente desfavorável para o crescimento e maturação folicular, além de causar luteinizações antecipadas nas mulheres, explicando algumas disfunções ovulatórias e menstruais em indivíduos com SOP (WILLIS et al., 1996).

Os adipócitos são responsáveis pela síntese e secreção das adipocinas que exercem importantes funções metabólicas e endocrinológicas (BURNS et al., 2010). O termo adipocina é um termo utilizado universalmente para descrever as proteínas que são sintetizadas pelos adipócitos, podendo essas adipocinas serem citocinas ou não citocinas. São proteínas solúveis que transmitem informações à células-alvo, interagindo com receptores específicos (PRADO et al., 2009).

A leptina é uma adipocina secretada principalmente pelo tecido adiposo e está diretamente relacionada com o acúmulo de massa gorda (CONSIDINE et al., 1996), já que ela retransmite sinais para o cérebro indicando a presença de gordura, mantendo a condição corporal por meio da supressão de apetite e aumentando o gasto de energia (DURHAM et al., 2019). A quantidade de energia estocada em tecido adiposo e as mudanças na ingestão de calorias afetam diretamente os níveis de leptina circulante (LICINO et al., 1997). Burns (2016) sugere que a leptina tem um importante papel na fisiopatologia da resistência à insulina nos equinos uma vez que Caltabilota et al (2010) relataram que altas concentrações de leptina estão diretamente ligadas a baixa resposta à insulina.

Outra adipocina que participa do metabolismo de resistência à insulina é a adiponectina. Essa proteína sintetizada pelo tecido adiposo é responsável pelo estímulo de captação da glicose pelas células hepáticas e musculares além de diminuir o acúmulo de triglicérides, tornando o organismo mais sensível à insulina (ÖZCAN DAĞ E DILBAZ, 2015). Porém, ao contrário das outras adipocinas, a adiponectina tem seus níveis reduzidos nos

indivíduos obesos, o que ocasiona na baixa resposta à insulina (GIL-CAMPOS et al., 2004). A diminuição dos níveis de adiponectina prejudicará também o perfil inflamatório do indivíduo acometido, já que ela exerce função anti-inflamatória estimulando a produção de mediadores anti-inflamatórios como a Interleucina-10 (IL-10) e suprimindo a expressão do Fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) por meio de um sinalizador intracelular Fator Nuclear Kappa- $\beta$  (NF-K $\beta$ ). Além disso, a adiponectina está diretamente relacionada à produção de óxido nítrico, que acarreta em alterações do perfil oxidativo do indivíduo (ANTONIADES et al., 2009).

O TNF $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória sintetizada não só, mas também pelo tecido adiposo, o que o torna uma adipocina. O aumento do ECC está diretamente relacionado com o aumento das concentrações sistêmicas dessa citocina. Além da resposta inflamatória, o TNF $\alpha$  inibe a ação da insulina na síntese do óxido nítrico, o que também contribui para o desequilíbrio oxidativo (ANTONIADES et al, 2009). Outras citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1-beta (IL-1 $\beta$ ) e a 6 (IL-6) exercem funções no metabolismo inflamatório de indivíduos de maior adiposidade e contribuem para o desenvolvimento da obesidade em humanos (ANTONIADES et al., 2009; VICK et al, 2007). É sabido que a expressão das citocinas inflamatórias circulantes está diretamente relacionada ao desenvolvimento da laminite (TADROS et al., 2013).

## **2.2 Perfil Oxidativo**

O desequilíbrio oxidativo, conhecido também como estresse oxidativo, é definido de maneira simples como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em que os agentes oxidantes ultrapassam a capacidade dos antioxidantes (SOFFLER, 2007). Na SME, o desequilíbrio acontece quando os níveis de energia ultrapassam a capacidade dos adipócitos de estocar mais energia, resultando em uma hipertrofia que acarretará no aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (FRANCISQUETI et al., 2017) como as que vimos anteriormente. O acúmulo de tecido adiposo influenciará no desequilíbrio oxidativo prejudicando a irrigação das células, levando à falta de oxigênio e necrose celular. Para eliminar as células mortas acontece um processo de fagocitose que resulta em liberação de radicais livres como o Óxido Nítrico, aumentando então os agentes oxidantes e levando ao desequilíbrio com os agentes antioxidantes. (FRANCISQUETI et al., 2017).

O desequilíbrio oxidativo leva a perda de função celular e tecidual além de contribuir para inflamação sistêmica e de diversos órgãos, inclusive do endométrio (SOFFLER, 2007).

O estado oxidante em mulheres pode influenciar no desenvolvimento inicial do embrião modificando os principais fatores de transcrição (AGARWAL et al., 2005).

Com a função de reduzir os danos que são causados pelos radicais livres ou das espécies reativas ao oxigênio (EROs), o sistema de defesa antioxidante pode agir impedindo que os radicais livres ou EROs se formem ou impedindo a ação deletéria dos mesmos. A defesa pode ser enzimática ou não-enzimática. O sistema não-enzimático consiste na ação de substâncias antioxidantes que podem se originar da dieta ou endogenamente. Dentre as substâncias antioxidante podemos encontrar: Vitaminas A, C, E, cobre, zinco manganês e selênio (BARBOSA et al., 2010). Já o sistema enzimático, enzimas como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) agem controlando a formação de radicais livres e as EROs (BARBOSA et al., 2010). Essas enzimas transformam o radical hidroxila em  $O_2$  que, posteriormente, será reduzido ao peróxido de hidrogênio e água (VALKO et al., 2007). Os sistemas antioxidantes estão interligados já que a atividade das enzimas é dependente de agentes antioxidantes que devem vir da dieta (BARBOSA et al., 2010).

A SOD age na conversão de  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  com o intuito de proteger as células dos danos oxidativos e das EROs, e se apresenta em duas formas, em diferentes lugares: CuZn-SOD, uma isoforma de cobre e zinco da enzima que está presente no citoplasma das células e Mn-SOD, a isoforma de manganês que é encontrada nas mitocôndrias (VINCENT et al, 2005).

A enzima GPx atua na defesa antioxidante catalisando reações de remoção do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos e utiliza como substrato um tripeptídeo formado pelo glutamato, glicina e cisteína chamado glutathione (GSH) (NG et al, 2007). A atuação da GPx depende do controle da relação da glutathione reduzida (GSH) e da glutathione oxidada (GSSG) (BARBOSA et al., 2010).

### **2.3 Análise histológica da inflamação endometrial**

A obesidade nas éguas está relacionada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias como  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$ , que têm papel importante na implantação embrionária e no processo de reconhecimento materno da gestação, mas quando em excesso, podem trazer prejuízos para o endométrio (SESSIONS-BRESNAHAM et al., 2018). O acúmulo de gordura pode não só estar ligado à inflamação endometrial como pode induzir modificações epigenéticas

no conceito por conta das altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (ROBLES et al., 2022).

A inflamação pode ser avaliada de acordo com o acúmulo de células inflamatórias no tecido. Pode ser caracterizada como aguda, quando apresenta leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), ou como crônica, quando tem a presença de linfócitos e outras células mononucleares (plasmócitos e macrófagos) (MCCUE, 2014). E ainda, eosinófilos podem ser indicadores de alguns processos inflamatórios específicos, como doenças fúngicas e em pneumovagina (SNIDER, 2011).

A inflamação além de ser classificada de acordo com o tempo (aguda ou crônica), também recebe outras classificações como: grau de severidade (suave, moderada, severa), pelos tipos de células (ex: linfócito, neutrófilo), e vários padrões (multifocal ou difuso; perivascular ou intersticial) (SNIDER, 2011).

Uma sequela inevitável da inflamação, principalmente se for repetida, é a fibrose, formação que também pode ocorrer por meio de uma via não inflamatória seguida de uma dilatação cística das glândulas (SNIDER, 2011). Células do estroma podem produzir colágeno em resposta a lesões ou estímulos, mesmo esse colágeno não cercando normalmente os ramos da glândula endometrial (SNIDER, 2011).

A presença de fibrose é permanente e sem tratamento, e pode ser classificada a partir da quantidade de camadas celulares de espessura, sendo de 1-3 leve, 4-10 moderada e 11 severa (SNIDER, 2011).

Kenney e Doig (1986) criaram um sistema para classificar o corte histológico do endométrio que leva em consideração inflamação e fibrose do tecido e que, a partir desses dados, fornece uma estimativa da habilidade da égua em conceber e manter uma gestação. Nesse sistema o útero é classificado da seguinte forma: grau I em que o endométrio está normal ou com o mínimo de inflamação ou fibrose focal, com mais de 80% de chance de conceber e manter a gestação; grau IIA com inflamação branda a moderada e/ou fibrose multifocal com 1-3 camadas de fibroblastos ao redor das glândulas ou menos de 2 ninhos fibróticos por campo linear de 5mm, podendo ter de 50-80% de chance de conceber e manter a gestação; grau IIB apresenta inflamação moderada e/ou fibrose multifocal-difusa com 4 ou mais camadas de fibroblasto ao redor das glândulas ou 2-4 ninhos fibróticos por campo linear de 5mm, tendo de 10-50% de chance de conceber e manter a gestação; e o grau III mostra inflamação severa e/ou fibrose difusa com 5 ou mais ninhos fibróticos por campo linear de 5mm, com menos de 10% de chance de conceber e manter a gestação.

### **3 HIPÓTESE**

Nossa hipótese é que éguas com SME possam ter um aumento da inflamação endometrial, elevando o grau de fibrose, relacionando a SME com piores graus do escore de Kenney e com menor capacidade de conceber uma gestação. Além disso, acreditamos que a SME possa ser relacionada também a um desequilíbrio oxidativo sérico.

### **4 OBJETIVO**

O objetivo desse trabalho é avaliar o potencial do endométrio em conceber uma gestação de acordo com o escore de Kenney, grau de fibrose, inflamação e linfangiectasia e o perfil oxidativo sérico de éguas com SME e comparar com o grupo de éguas controle.

### **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **5.1 Classificação dos grupos**

O projeto foi aprovado pelo sistema da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com número de processo 1325241018. O experimento foi conduzido na Fazenda Santa Rita II, localizada em Piracaia - SP, durante as estações de monta 2019/2020 e 2020/2021. Foram utilizadas no total 10 éguas solteiras da raça Mangalarga Paulista, entre 3 e 15 anos de idade, mantidas sob regime de pasto e suplementadas com concentrado.

Os animais foram classificados em dois grupos, sendo eles Síndrome Metabólica Equina e Controle. Os animais que não apresentaram índices para serem classificados nos grupos estudados foram excluídos do experimento. Para isso, foram coletadas dos animais em jejum de concentrado amostras de sangue por venopunção jugular em tubos para plasma (Vacuplast®, com anticoagulante Fluoreto de Potássio) para análise de glicose e para soro (Vacuplast®, sem anticoagulante) para dosagem de insulina, para avaliação da resistência à insulina por meio da utilização de dois índices, o inverso da raiz quadrada da insulina ( $RISQI = 1/\sqrt{\text{concentração insulina basal}}$ ) e a razão insulina-glicose modificada ( $MIRG = [800 - 0,3 \times (\text{concentração insulina basal} - 50)^2] / (\text{concentração glicose basal} - 30)$ ) (TREIBER et al., 2005). As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 3000g, aliquotadas em criotubos (eppendorfs®) identificados e armazenados em freezer -20°C

para futuras análises. A avaliação da concentração sérica de glicose foi feita no Laboratório da Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo utilizando o analisador bioquímico automático (RX Daytona), com o auxílio do kit específico da Randox® (GL3815). A análise da insulina foi feita via radioimunoensaio com auxílio do kit PI-12K da Milipore® no B.E.T Lab, no Rio de Janeiro. Para o uso dos kits comerciais de dosagem de glicose e insulina foram feitos os procedimentos especificados pelos fabricantes. Para a separação dos grupos, animais que apresentaram RISQI  $\geq 0,32$  e MIRG  $< 5,50$ , serão do grupo controle e os que apresentarem RISQI  $< 0,32$  e MIRG  $> 5,50$  serão do grupo Síndrome Metabólica Equina (SESSIONS-BRESNAHAM e CARNEVALE, 2014). Os animais que apresentaram RISQI  $> 0,32$  e MIRG  $> 5,50$  foram descartados do experimento.

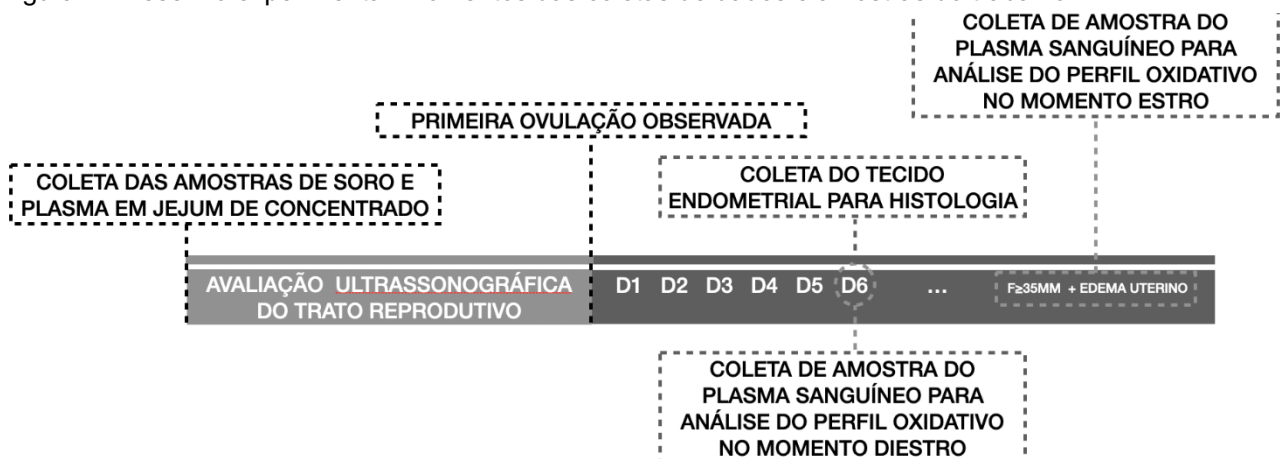
## 5.2 Avaliação do trato reprodutivo

A partir de Setembro de 2019, data estipulada para o início do experimento, com o auxílio de um aparelho ultrassonográfico Medisono®, modelo P3V, as éguas foram acompanhadas até que a primeira ovulação fosse observada.

Alterações relevantes como cistos endometriais e indicativos no exame ultrassonográfico transretal de endometrite, que poderiam comprometer o resultado da pesquisa, foram critério de descarte do experimento.

Utilizando da ultrassonografia transretal, foram feitas avaliações uterinas e cervicais quanto a tônus e ecogenicidade nos dias da ovulação, no diestro (seis dias após a ovulação) e no estro (quando houve folículo  $\geq 35$  mm com edema uterino e sem a presença de corpo lúteo funcional). As fases do experimento podem ser observadas no desenho experimental (Figura 1).

Figura 1 - Desenho experimental. Momentos das coletas de dados e amostras do trabalho.



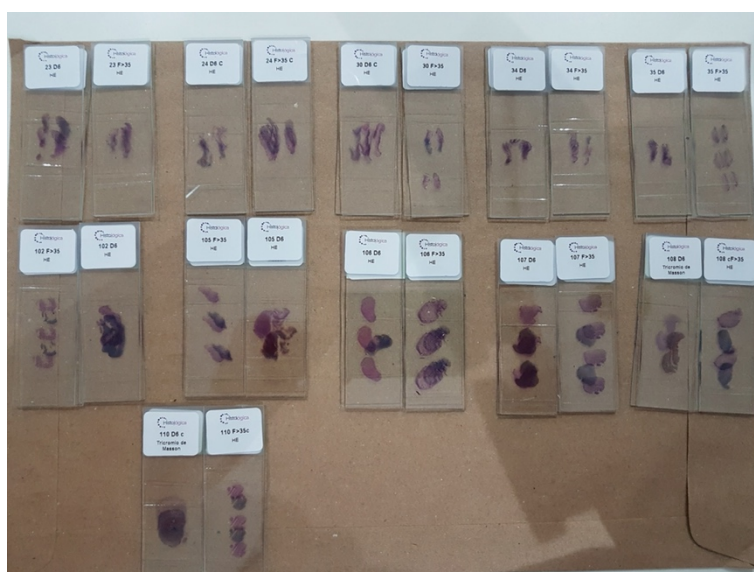
### 5.3 Biópsias endometriais

No diestro, seis dias após a segunda ovulação (D6), foi realizada a coleta de uma amostra do tecido endometrial por meio de biópsia, da região da bifurcação entre os cornos uterinos, com auxílio de uma pinça de biópsia de Botucatu® e utilizando a técnica descrita por Kenney (1978). O tecido foi colocado em cassete histológico e fixado em solução de paraformaldeído 4% para análise histológica.

### 5.4 Análises Histológicas

O tecido endometrial coletado por meio de biópsia, foi fixado em paraformaldeído 4% em cassetes histológicos e passou por processos de desidratação, utilizando álcool etílico; clarificação, para remoção do álcool, utilizando xilol que também prepara o tecido para a penetração da parafina e, por fim, a infiltração de parafina em que o tecido passa pelo menos duas vezes por parafina líquida, aquecida entre 56°C e 60°C em estufa. Após o processamento foi feita a inclusão do tecido, que consiste em retirar os tecidos da parafina líquida e colocar em moldes, também com parafina. Visando uma boa análise no microscópio de luz, foram feitos cortes finos (entre 4 e 6 µm) e então colocados sob lamina de vidro para serem corados (figura 2). Os corantes utilizados foram hematoxilina, para coloração dos núcleos em roxo, e eosina, para coloração do citoplasma e espaços intercelulares em rosa (CAPUTO et al., 2013).

Figura 2– Finos cortes de tecido endometrial em lâminas de vidro, corados em eosina e hematoxilina.



Fonte: (BARBOSA, 2022).

D6: dia 6 após a ovulação; F>35mm: presença de folículo maior que 35 mm e edema uterino



A análise histológica foi realizada utilizando o escore descrito por Kenney em 1978 e revisado por Kenney e Doig em 1986, onde para definição do grau de inflamação foram considerados os seguintes critérios: severidade e distribuição de fibrose como prioridade, tendo em vista sua irreversibilidade, e secundariamente outros critérios tais como inflamação e linfangiectasia, no entanto o grau de severidade e distribuição destes também influenciam a definição do grau neste estudo. As amostras coradas foram analisadas por toda sua extensão, em aumento de 20x e 40x, no microscópio de modelo Olympus BX43®.

A amostra foi classificada no escore de Kenney como grau I quando o endométrio apresentou ausência ou o mínimo de inflamação ou fibrose focal, como grau IIA se foi observado inflamação branda a moderada e/ou fibrose multifocal com 1-3 camadas de fibroblastos ao redor das glândulas ou menos de 2 ninhos fibróticos por campo linear de 5mm, grau IIB se apresentou inflamação moderada e/ou fibrose multifocal-difusa com 4 ou mais camadas de fibroblasto ao redor das glândulas ou 2-4 ninhos fibróticos por campo linear de 5mm e grau III se mostrou inflamação severa e/ou fibrose difusa com 5 ou mais ninhos fibróticos por campo linear de 5mm. O grau de fibrose foi considerado brando quando foi observado 1 a 3 camadas, moderada de 4 a 10 camadas ou severa quando vista mais de 11 camadas de fibrose. A inflamação foi categorizada pela presença e distribuição dos infiltrados leucocitários. Quando não foi encontrado infiltrados leucocitários foi considerada inflamação ausente, quando os infiltrados apresentaram células polimorfonucleares de forma focal, foi considerada branda e quando multifocal, mínima. A linfangiectasia foi apontada quando observado dilatações glandulares e lacunas linfáticas e classificada de acordo com o tamanho e quantidade das glândulas dilatadas.

## **5.5 Estabelecimento do Perfil Oxidativo**

Nos momentos diestro, seis dias após a ovulação e estro, quando houve presença de folículo  $\geq 35$ mm com edema uterino e sem a presença de corpo lúteo, foram coletadas amostras de sangue por venopunção jugular em tubos estéreis para plasma Vacuplast®, com anticoagulante EDTA, para estabelecimento do perfil oxidativo. O sangue coletado foi centrifugado por 30 minutos, a 3000g, o plasma foi separado e aliqotado em criotubos *Eppendorf*® e então armazenado em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram analisadas para oxidação de proteínas, com metodologia baseada em Levine et al. (1990) e Odetti et al. (1996) modificada e padronizada para a espécie equina. A peroxidação lipídica foi avaliada por meio do teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). A quantificação da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) foi realizada por meio da técnica

descrita por Nichi et al. (2007) e a determinação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) foi realizada segundo a técnica proposta por Flohé e Ötting (1984).

Para realizar a quantificação da GPx foi usado 10,15014g da solução  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (PM= 141,96) dissolvida em 500mL de água mili Q; 1,973257g da solução  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (PM = 137,99) dissolvida em 100mL de água mili Q; 1,172556g de EDTA (6,3 mM) e tampão fosfato de sódio (143 mM) dissolvido em 400mL de solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , com adição de 100mL de solução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e ajustando o pH para 7,5.

Foram feitas 50 amostras de 0,0162g do reagente azida sódica (0,25 M; PM = 65,01) dissolvidas em 1mL de tampão fosfato de sódio (143 mM); 10 amostras de 0,002 g do reagente NADPH (0,2 mM) dissolvidas em 10 mL de tampão fosfato de sódio (143 mM) que foram colocadas em recipientes âmbar; 500 amostras de 0,3050g do reagente glutathiona reduzida – GSH (20 mM) dissolvidas em 50mL de água mili Q colocadas em recipientes âmbar; 50 amostras de 41,6µl da enzima glutathiona redutase – GSSG diluídas em 958µl de tampão fosfato de sódio (143 mM) colocadas em recipientes âmbar; e 90 amostras de 20µl do reagente t-Butilhidroperóxido - tBPH diluídas em 8670 µl de água mili Q colocadas em um recipiente âmbar.

Para determinar a atividade da SOD foi usado 3,55g da solução  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (PM = 142; 50 mM) dissolvida em 500mL de água mili Q; 0,344975g da solução  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (PM = 137,99; 50 mM) dissolvida em 50mL de água mili Q; 0,0204732g de EDTA (0,1 mM) e tampão fosfato de sódio (50 mM) dissolvido em 500mL da solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , com adição de 50mL da solução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e ajustando o pH para 7,8; 0,04 g da solução NaOH (0,001 M) dissolvida em 1L de água mili Q; 0,037224g de EDTA (0,1 mM) dissolvida em 1L de água mili Q.

Foram feitas 1 amostra de 0,0038 g do reagente xantina dissolvida em 50mL de solução de NaOH (0,001 M); 1 amostra de 0,0124g do reagente citocromo C dissolvida em 50mL de tampão fosfato de sódio (50mM) que foi colocada em um tubo âmbar; 1 amostra com 5mL da solução de xantina adicionada nos 50mL da solução de citocromo C mantida em um tubo âmbar; e 1 amostra de 2µl do reagente xantina oxidase adicionada em 200µl de solução de EDTA (0,1 mM) colocada em um tubo âmbar.

## 5.6 Análise estatística

Para a análise estatística, inicialmente, foi realizada análise descritiva dos dados com frequências simples e relativas das variáveis, estimativas da média, mediana, desvio padrão e intervalo interquartil.

As variáveis também foram analisadas em relação ao grupos e momentos. Para avaliar a associação entre os grupos em cada momento foi utilizado o teste de qui-quadrado e para avaliar a associação entre os momentos em cada grupo foi utilizado o teste Q de Cochran. Para comparação entre grupos e momentos foram utilizados os testes de Mann-Whitney, Wilcoxon, Teste T e Teste T pareado.

Para melhor visualização destas análises, foram produzidos gráficos de barras percentuais e boxplot. O nível de significância utilizado foi de 5% e todas as análises foram realizadas no ambiente R 4.0.4 (R CORE TEAM, 2021).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Classificação dos grupos

A separação dos grupos pelos índices RISQI e MIRG está representada na Tabela 1. Cinco animais foram classificados como Síndrome Metabólica Equina (SME) pois apresentaram  $RISQI < 0.30$  e  $MIRG > 5.50$ . Das cinco éguas estimadas para o grupo controle, apenas duas éguas apresentaram  $RISQI \geq 0.32$  e  $MIRG < 5.50$  e foram classificadas no grupo Controle (CON). As outras três éguas apresentaram  $RISQI \geq 0.32$  porém o  $MIRG > 5.50$ , não tendo índices para serem classificadas como SME ou CON, e foram descartadas deste estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação das éguas nos grupos estudados (SME e CON) e animais descartados do experimento de acordo com os índices RISQI e MIRG.

IDENTIFICAÇÃO	GRUPO	RISQI	MIRG
23	SME	0,17	12,74
24	SME	0,18	12,69
30	SME	0,19	9,93
35	SME	0,21	9,39
34	SME	0,23	12,84
108	CON	0,54	4,43
110	CON	0,56	3,11
107	EXCLUSÃO	0,32	7,09
105	EXCLUSÃO	0,37	7,57
102	EXCLUSÃO	0,34	5,58

SME: Síndrome Metabólica Equina; CON: Controle;  $RISQI = 1/\sqrt{\text{concentração insulina basal e a razão insulina-glicose modificada}}$  ( $MIRG = [800 - 0.3 \times (\text{concentração insulina basal} - 50)^2] / (\text{concentração glicose basal} - 30)$ ).

## 6.2 Histologia endometrial

A frequência das classificações que foram observadas nas variáveis escore de Kenney, inflamação, fibrose e linfangiectasia foram apresentadas pela tabela 2. Não houve diferença entre os grupos para as variáveis escore de Kenney ( $p=1$ ), fibrose ( $p=0,292$ ) e inflamação ( $p=0,526$ ). A linfangiectasia esteve mais presente no grupo controle e ausente no grupo Síndrome Metabólica Equina e esse resultado está próximo de obter uma diferença estatística ( $P=0,058$ ), considerando  $P<0,05$  como ponto de significância.

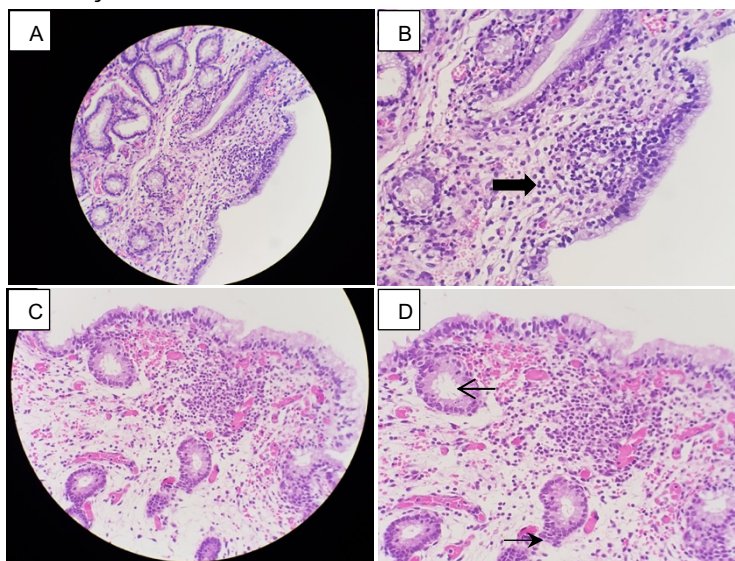
As variáveis estudadas para determinação do escore de Kenney, grau de fibrose, inflamação e linfangiectasia também foram avaliadas de forma individual entre os grupos e estão apresentadas em forma de gráficos (Gráficos 1, 2, 3 e 4).

Tabela 2 - Frequência das classificações das variáveis escore de Kenney, Fibrose, Inflamação e Linfangiectasia entre os grupos SME e CON e o valor P entre os grupos.

Variável	Classificação	GRUPO				P
		SME		CON		
		N	%col	N	%col	
Escore Kenney	I	2	40	1	50	1
	IIA	3	60	1	50	
Fibrose	Ausente	1	20	2	100	0,292
	Branda	2	40	0	0	
	Mínima	1	20	0	0	
	Moderada	1	20	0	0	
Inflamação	Ausente	1	20	1	50	0,526
	Branda	2	40	0	0	
	Mínima	2	40	1	50	
Linfangiectasia	Ausente	5	100	0	0	0,058
	Branda	0	0	0	0	
	Marcada	0	0	2	100	

SME: Síndrome Metabólica Equina; CON: Controle; N: número de elementos observados; %col: percentual calculado pelo total da coluna como denominador

Figura 3 – Cortes histológicos de tecido endometrial de éguas corados em Eosina e Hematxilina e classificados com escore I e IIA de acordo com o grau e a distribuição da inflamação e fibrose.

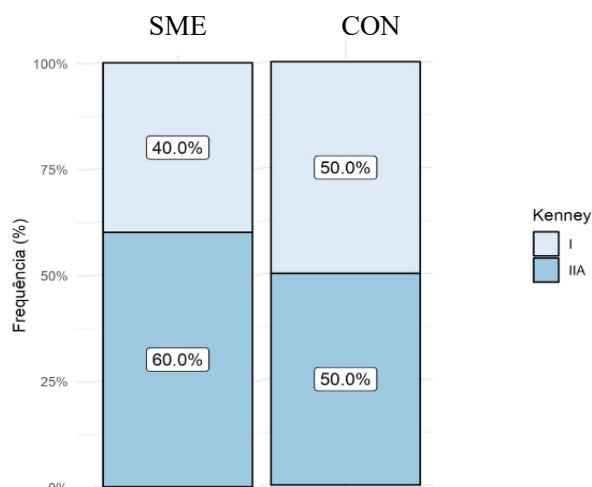


Fonte: (BARBOSA, 2022).

Corte histológico de endométrio classificado como grau I do escore Kenney (A: HE – 40x; B: HE – 100x) com a presença de linfócitos ( ➡); Corte histológico de endométrio classificado como grau IIA do escore Kenney (C: HE – 40x; D: HE – 100x) com a presença de fibrose moderada e dilatação glandular ( ⚡) e infiltrado polimorfonuclear ( ➡).

O gráfico 1 apresenta o escore Kenney das amostras de tecido endometrial dos grupos SME e CON. Ambos os grupos obtiveram escores I ou IIA, mostrando aptidão em conceber uma gestação de até 80%. Como visto na Tabela 2, não houve diferença entre os grupos (P=1) para a variável escore de Kenney.

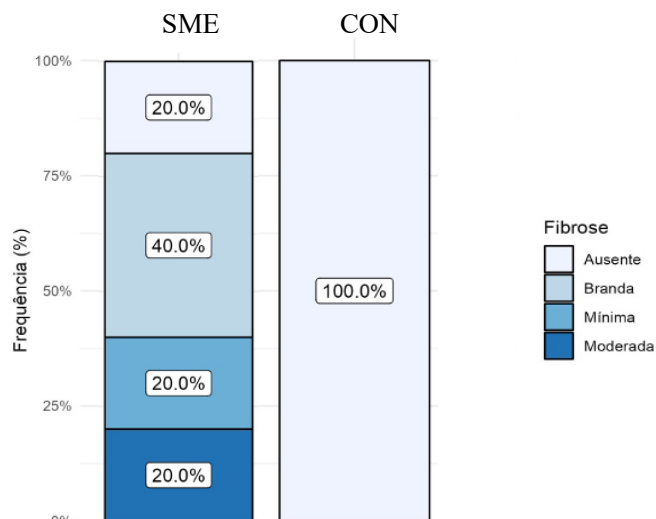
Gráfico 1 - Gráfico de barras relacionando a variável Escore Kenney entre os grupos SME e CON.



SME: Síndrome Metabólica Equina; CON: Controle; Não houve diferença estatística (p=1).

O grau de fibrose do tecido endometrial está representado individualmente e relacionado entre os dois grupos no gráfico 2. Apesar de numericamente as éguas do grupo SME se mostrarem com piores graus de fibrose em relação ao grupo CON, a variável não apresentou diferença estatística ( $P=0,292$ ) (Tabela 2).

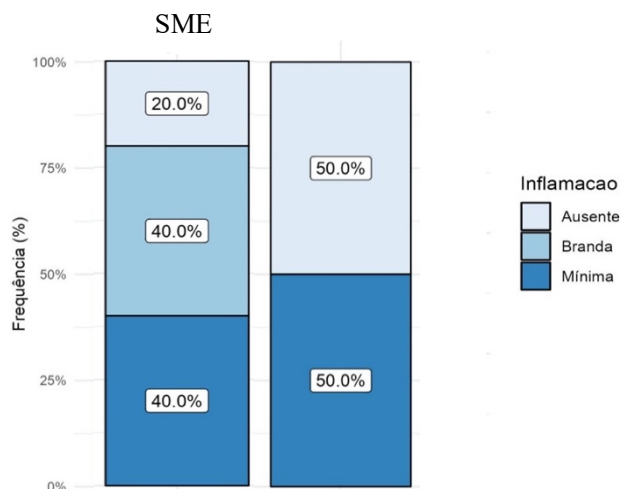
Gráfico 2 - Gráfico de barras relacionando a incidência dos diferentes graus de Fibrose entre grupos SME e CON.



SME: Síndrome Metabólica Equina; CON: Controle  
Não houve diferença estatística ( $p=0,292$ )

No gráfico 3 está representado o grau de inflamação mostrado nas amostras de tecido endometrial dos diferentes grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos SME e CON ( $P=0,562$ ) (Tabela 2).

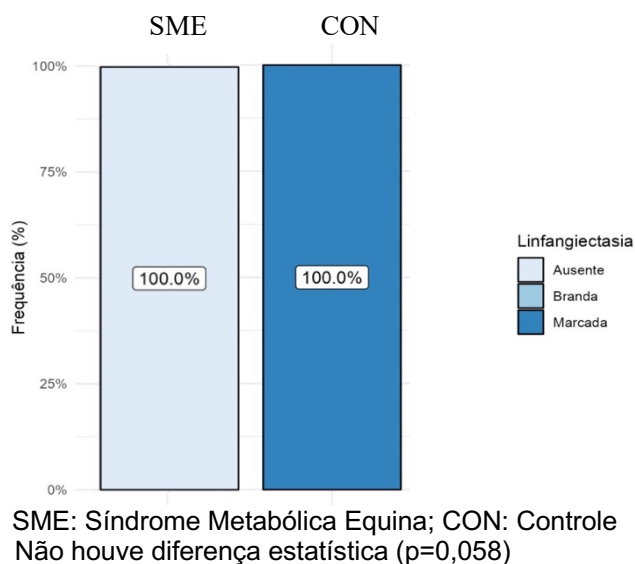
Gráfico 3 - Gráfico de barras relacionando a incidência dos diferentes graus de Inflamação entre os grupos SME e CON.



SME: Síndrome Metabólica Equina; CON: Controle  
Não houve diferença estatística ( $p=0,526$ )

A linfangiectasia é apresentada no gráfico 4. Todas as éguas do grupo controle apresentaram linfangiectasia na amostra endometrial coletada seis dias após a ovulação enquanto nenhuma égua do grupo SME apresentou essa característica. Apesar da diferença numérica, não houve diferença estatística ( $P=0,058$ ) (Tabela 2).

Gráfico 4 - Gráfico de barras relacionando os graus de Linfangiectasia entre os grupos SME e CON.



### 6.3 Perfil Oxidativo

A atividade da SOD não mostrou diferença estatística ( $P=0,082$ ) no momento diestro, no momento estro também não houve diferença entre os grupos ( $P=0,808$ ). A atividade da enzima GPx não mostrou diferença entre os grupos durante o diestro, mas durante o estro o grupo SME mostrou aumento significativo da atividade dessa enzima, podendo ser observada uma diferença estatística ( $P=0,044$ ). Em ambos os momentos, as concentrações de TBARS e Óxido Nítrico não diferiram entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3 - Média  $\pm$  desvio padrão da atividade da SOD, atividade da GPx, concentração das TBARS, concentração do Óxido Nítrico entre os grupos.

Variável	Momentos	SME	CON	P
ATIVIDADE DA SOD	Diestro	0,0054 $\pm$ 0,0039	0,0014 $\pm$ 0,00092	0,082
	Estro	0,01 $\pm$ 0,0073	0,012 $\pm$ 0,0064	0,808
ATIVIDADE DA GPx	Diestro	45,21 $\pm$ 26,6	75,24 $\pm$ 21,37	0,238
	Estro	65,27 $\pm$ 32,49	18,33 $\pm$ 13,19	<b>0,044</b>
CONCENTRAÇÃO TBARS (ng/mL)	Diestro	112,96 $\pm$ 2,25	114,95 $\pm$ 9,83	1,000
	Estro	135,86 $\pm$ 56,78	116,35 $\pm$ 7	0,857
ÓXIDO NÍTRICO (mM)	Diestro	2,57 $\pm$ 0,011	2,52 $\pm$ 0,051	0,241
	Estro	2,57 $\pm$ 0,006	2,56 $\pm$ 0,008	0,095

Fonte: (BARBOSA, 2022).

SOD: Superóxido Dismutase; GPx: Glutathione Peroxidase; TBARS: Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; SME: Síndrome Metabólica Equina; CON: Controle; Diestro: seis dias após ovulação; Estro: quando há presença de folículo  $\geq 35$ mm com edema uterino. P=0,044 representa uma diferença estatística da atividade da enzima GPx durante o estro entre os grupos SME e CON. Valor de P $\leq$ 0,05.

## 7 DISCUSSÃO

O teste para detecção da condição da Síndrome Metabólica Equina foi feito conforme Treiber et al. (2005) e Sessions-Bresnahan et al. (2018) avaliando a insulina e a glicose basais. Embora nenhum teste padrão-ouro tenha sido determinado, os testes dinâmicos são mais sensíveis do que os testes basais e fornecem uma imagem mais completa da dinâmica glicose-insulina como o teste utilizado por Vick et al. (2007). Como na classificação dos grupos foram encontradas três éguas que não apresentaram os índices RISQI e MIRG para nenhum dos grupos estudados, acreditamos que um teste dinâmico poderia ter dado um resultado diferente e, assim, ampliado o grupo controle ou SME.

Os grupos SME e CON se mostraram semelhantes quanto ao escore de Kenney (p=1), sendo que ambos os grupos mostraram os escores I e IIA, tendo probabilidade de até 80% de chance de manter uma gestação segundo Kenney e Doig (1986), não mostrando relação entre a SME e danos teciduais no endométrio causado pela inflamação.

Sabendo que a fibrose é uma sequela inevitável da inflamação (SNIDER, 2011), era esperado que, por conta da relação da SME com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, as éguas do grupo SME obtivessem piores resultados quanto ao grau de fibrose endometrial. E apesar de não termos encontrado diferença estatística entre os grupos (p=0,292) é possível observar que as éguas do grupo controle não apresentaram fibrose enquanto a maior parte das éguas do grupo SME mostraram fibrose branda, mínima ou



moderada. Nesse caso, acreditamos que a falta de homogeneidade do número de amostras estudadas, grupo SME n=5 e grupo CON n=2, possa ter prejudicado a análise estatística e novas análises e mais estudos são necessários para entender se há relação da fibrose endometrial com a Síndrome Metabólica Equina.

Assim como a fibrose, na análise de inflamação endometrial também era esperado que o grupo SME apresentasse os piores resultados. E apesar também de não haver diferença estatística entre os grupos ( $p=0,526$ ), numericamente as amostras do grupo SME mostraram mais inflamação em relação ao grupo controle, sendo que 4 éguas do grupo SME apresentaram inflamação branda ou mínima enquanto 1 égua do grupo controle apresentou inflamação mínima, corroborando com a hipótese que uma ampliação do número experimental pudesse trazer mais diferenças estatisticamente relevantes a esse experimento.

Apesar de todas as éguas do grupo controle apresentarem linfangiectasia no tecido endometrial versus nenhuma das éguas do grupo SME, não houve diferença estatística nesse estudo ( $p=0,058$ ). Isso também pode ser consequência da grande diferença entre o número de amostras em cada grupo estudado. Schoon e colegas (1999) demonstram que a linfangiectasia acontece fisiologicamente no início do estro e acaba rapidamente após a ovulação. A linfangiectasia nas amostras analisadas neste estudo, apareceu apenas nas éguas do grupo controle, porém, as amostras foram coletadas durante o diestro. Era esperado que não fosse encontrado linfangiectasia durante o diestro ou que fosse encontrado no grupo SME, como possível fator de subfertilidade uma vez que a linfangiectasia está correlacionada, junto com outras características como fibrose periglandular e degeneração vascular, com a dificuldade da limpeza uterina de bactérias, fluidos e debris e com éguas susceptíveis a endometrites persistentes pós-cobertura (PASOLINI et al., 2016).

Ao nosso conhecimento, nada foi relatado sobre o estresse oxidativo sérico em éguas com SME no estro e no diestro. Abdelnaby et al. (2020), entretanto mostraram que existe relação entre as endometrites e o estresse oxidativo sérico, uma vez que em seu trabalho foi observado aumento das EROS como o Óxido Nítrico e o Malondialdeído, associado ao aumento da peroxidação lipídica, e à diminuição da atividade das enzimas antioxidantes ou a capacidade antioxidante total em éguas com inflamação endometrial.

Em outras espécies como em vacas, camelos e camundongos também foi possível relacionar as inflamações endometriais com o aumento do Óxido Nítrico e a diminuição da capacidade antioxidante total (KAYA et al., 2017). Em humanos, também foi possível observar desbalanços entre os agentes oxidantes e antioxidantes em indivíduos obesos

(Vincent et al., 2005). O presente estudo apresentou uma diferença numérica com discreto aumento de Óxido Nítrico no plasma sanguíneo de éguas com SME durante o estro em relação às éguas do grupo CON, não alcançando uma diferença estatística ( $p=0,095$ ). Durante o diestro não foi observada diferença entre os níveis de Óxido Nítrico entre os grupos ( $p=0,241$ ) e em ambos os momentos também não houve diferença na peroxidação lipídica (estro,  $p=0,857$ ; diestro,  $p=1$ ). Entretanto, em contraste com os trabalhos que apresentaram menor capacidade antioxidante nos grupos afetados pela inflamação, neste estudo a atividade da GPx foi estatisticamente maior no grupo SME ( $p=0,044$ ) durante o estro, mostrando que não há perda da capacidade antioxidante nestes animais. Já a atividade da SOD no diestro se aproximou de uma diferença estatística significativa ( $p=0,082$ ) enquanto no estro não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,808$ ).

## **8 CONCLUSÃO**

Esse trabalho não encontrou relação com a SME e a baixa capacidade do endométrio em conceber uma gestação uma vez que não houve diferença estatística do escore de Kenney entre os grupos.

O estudo observou clara diferença estatística entre os dois grupos na atividade da enzima antioxidante GPx durante o estro e foi então possível concluir que as éguas com SME possuem maior desafio oxidativo no estro comparado com éguas sem SME e o sistema antioxidante enzimático é capaz de equilibrar os agentes oxidantes e antioxidantes. Não foi possível relacionar estresse oxidativo à SME.

Como os dados deste estudo são limitados devido ao pequeno tamanho da amostra, sugere-se a realização de um estudo semelhante com um tamanho maior e distribuição amostral homogênea.

## REFERÊNCIAS

ABDELNABY, E. A., EMAM, I. A., SALEM, N. Y., RAMADAN, E. S., KHATTAB, M. S., FARGHALI, H. A., & ABD EL KADER, N. A. Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mares with endometritis. **Theriogenology**, v. 158, p. 112-120, 2020.

AGARWAL, A., GUPTA, S., & SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 28, 2005.

ANTONIADES, C., ANTONOPOULOS, A. S., TOUSOULIS, D., & STEFANADIS, C. Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease. **Journal compilation International Association for the Study of Obesity. Obesity reviews**, v. 10, p. 269–279, 2009.

BALEN, A. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology. **Best practice & research clinical obstetrics & gynaecology**, v. 18(5), p. 685-706, 2004.

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

BARBOSA, K. B. F., BRESSAN, J., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. C. G., PAULA, S. O. & MINIM, V. P. R. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23(4), p. 629-643, 2010.

BURNS, T. A., GEOR, R. J., MUDGE, M. C., MCCUTCHEON, L. J., HINCHCLIFF, K. W., & BELKNAP, J. K. Proinflammatory Cytokine and Chemokine Gene Expression Profiles in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Depots of Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Light Breed Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24(4), p. 932-939, 2010.

BURNS, T. A. Effects of common equine endocrine diseases on reproduction. **Equine Internal Medicine**, Department of Veterinary Clinical Sciences – The Ohio State University, College of Veterinary Medicine, v. 32(3), p. 435-449, 2016.

CALTABILOTA, T. J., EARL, L. R., THOMPSON, D. L., JR, CLAVIER, S. E., & MITCHAM, P. B. Hyperleptinemia in mares and geldings: assessment of insulin sensitivity from glucose responses to insulin injection. **Journal of Animal Science**, v. 88(9), p. 2940-2949, 2010

CAPUTO, L. F. G., MOLINARO, E. M., AMENDOEIRA, M. R. R. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. **Ed. Oswaldo Cruz**, V. 3, 2016.

CARTER, R. A., GEOR, R. J., BURTON STANIAR, W., CUBITT, T. A., & HARRIS, P. A. Apparent adiposity assessed by standardized scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. **Veterinary Journal**, v.179(2), p. 204–210, 2009.

CHRISTOFFERSEN, M., WOODWARD, E., BOJESEN, A. M., JACOBSEN, S., PETERSEN, M. R., TROEDSSON, M. H. T. & LEHN-JENSEN, H. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Veterinary Research**, v. 8(41), 2012.

DAĞ, Z. Ö. & DILBAZ, B. Impact of obesity on infertility in women. **Journal of the Turkish German Gynecological Association**, vol. 16(2), p. 111, 2015.

DURHAM, A. E., FRANK, N., MCGOWAN, C. M., MENZIES-GOW, N. J., ROELFSEMA, E., VERVUERT, I., FEIGE, K., & FEY, K. ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, p. 335-349, 2019.

EHRMANN, D. A. Polycystic ovary syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 352(12), p. 1223-1236, 2005.

FLOHÉ, L. & ÖTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 93-104, 1984.

FRANCISQUETI, F. V., CHIAVERINI, L. C. T., SANTOS, K. C., MINATEL, I. O., RONCHI, C. B., FERRON, A. J. T., FERREIRA, A. L. A., & CORRÊA, C. R. O papel do estresse

oxidativo na fisiopatologia da síndrome metabólica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63(1), p. 85-91, 2017.

FRANK, N. Equine metabolic syndrome. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 27(1), p. 73-92, 2011.

WILLIS, D., MASON, H., GILLING-SMITH, C., & FRANKS, S. (1996). Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81(1), p. 302–309, 1996.

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

GIL-CAMPOS, M., CAÑETE, R. R., & GIL, A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. **Clinical nutrition**, v. 23(5), p. 963-74, 2004.

KAYA, S., ÖĞÜN, M., ÖZEN, H., KURU, M., SAHIN, L., KÜKÜRT, A. & KAÇAR, C. The Impact of Endometritis on Specific Oxidative Stress Parameters in Cows. **J Hellenic Vet Med SOC**, v. 68(2), 2017.

KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal of Animal Veterinary Medicine Association**, v. 172, p. 241-262, 1978.

KENNEY, R.M. & DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy: Current therapy. **Theriogenology**, v. 2, p. 723-729, 1986.

KIM, F., GALLIS, B., & CORSON, M. A. TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 280(5), p. 1057-1065, 2001.

LEVINE, R. L., GARLAND, D., OLIVER, C. N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A. G., AHN, B. W., SHALTIEL, S., & STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LICINIO, J., MANTZOROS, C., NEGRÃO, A. B., CIZZA, G., WONG, M. L., BONGIORNO, P. B., CHROUSOS, G. P., KARP, B., ALLEN, C., FLIER, J. S., & GOLD, P. W. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. **Nature Medicine**, v. 3(5), p. 575-9, 1997.

LOPES, I. M., BARACAT, M. C., SIMÕES, M., SIMÕES, R. S., BARACAT, E. C., & SOARES, J. M. Endometrium in women with polycystic ovary syndrome during the window of implantation. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57(6), p. 702-709, 2011.

MCCUE, P. M. Endometrial Biopsy. **Equine Reproductive Procedures**, v.1, c. 19 p. 68-70, 2021.

NG, C. F., SCHAFFER, F. Q., BUETTNER, G. R., & RODGERS, V. G. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and GPx concentrations. **Free radical research**, v. 41(11), p. 1201–1211, 2007.

NICHI, M., GOOVAERTS, I. G., CORTADA, C. N., BARNABE, V. H., DE CLERCQ, J. B., & BOLS, P. E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. **Theriogenology**, v. 67(2), p. 334-340, 2007.

ODETTI, P., TRAVERSO, N., COSSO, L., NOBERASCO, G., PRONZATO, M. A., & MARINARI, U. M. Good glycaemic control reduces oxidation and glycation end-products in collagen of diabetic rats. **Diabetologia**, v. 39(12), p. 1440-1447, 1996.

OWERS, R. & CHUBBOCK, S. Fight the fat! **Equine Veterinary Journal**, v. 45, p. 5, 2013.

PASOLINI, M. P. , PRETE, C. D. , FABBRI, S., & AULETTA, L. Endometritis and Infertility in the Mare – The Challenge in Equine Breeding Industry–A Review Genital Infections and Infertility – **IntechOpen**, 2019 <<http://dx.doi.org/10.5772/62461>>

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021, <<https://www.R-project.org/>>

RAMBAGS, B. P., VAN ROSSEM, A. W., BLOK, E. E., DE GRAAF-ROELFSEMA, E., KINDAHL, H., VAN DER KOLK, J. H., & STOUT, T. A. Effects of exogenous insulin on luteolysis and reproductive cyclicity in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43(4), p. 422–428, 2008.

Robles, M., Loux, S., de Mestre, A. M., & Chavatte-Palmer, P. Environmental constraints and pathologies that modulate equine placental genes and development. **Reproduction**, v. 163(3), p. 25–38, 2022.

SCHOON, D., SCHOON, H., & KLUG, E. Angioses in the equine endometrium-pathogenesis and clinical correlations. **Pferdeheilkunde**, v. 15, p. 541-546, 1999.

SESSIONS-BRESNAHAN, D. R. & CARNEVALE, E. M. The effect of equine metabolic syndrome on the ovarian follicular environment. **Journal of Animal Science**, v. 92(4), p. 1485-1494, 2014.

SESSIONS-BRESNAHAN, D. R., HEUBERGER, A. L., & CARNEVALE, E. M. Obesity in mares promotes uterine inflammation and alters embryo lipid fingerprints and homeostasis. **Biology of Reproduction**, v. 99(4), p. 761-772, 2018.

SILLENCE, M.N. “Supersize me” On equine obesity. **Veterinary Journal**, v. 194(2), p. 137-138, 2012.

SNIDER, T., SEPOY, C., & HOLYOAK, G. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation and application of histopathologic data. **Theriogenology**, v. 75, p. 1567-1581, 2011.

SOFFLER, C. Oxidative Stress. **Veterinary Clinic North America Equine Practice**, v. 23(1), p.135-157, 2007.

TADROS, E. M., FRANK, N. & HOROHOV, D. W. Inflammatory Cytokine Gene Expression in Blood During the Development of Oligofructose-Induced Laminitis in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33(10), p. 802-808, 2013.

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(10), p 2357-2364, 2005.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M., & TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cellular Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VICK, M. M., SESSIONS, D. R., MURPHY, B. A., KENNEDY, E. L., REEDY, S. E., & FITZGERALD, B. P. Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: effects of metmorfirm on insulin sensivity and reproductive cyclicity. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 609—617, 2006.

VICK, M. M., ADAMS, A. A., MURPHY, B. A., SESSIONS, D. R., HOROHOV, D. W., COOK, R. F., SHELTON, B. J., & FITZGERALD, B. P. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. **Journal of Animal Science**, v. 85(5), p. 1144–1155, 2007.

VINCENT, H. K. & TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International Journal of Obesity**, v. 30(3), p. 400-418, 2005.