

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Camila Cantarelli

**RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE E OCORRÊNCIA DE SÍNDROME
METABÓLICA EQUINA EM CAVALOS CRIoulos**

**Santa Maria, RS
2017**

Camila Cantarelli

**RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE E OCORRÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA
EQUINA EM CAVALOS CRIoulos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. PhD. Flávio Desessards De La Corte

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cantarelli, Camila
RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE E OCORRÊNCIA DE SÍNDROME
METABÓLICA EQUINA EM CAVALOS CRIoulos / Camila
Cantarelli.- 2017.
48 p.; 30 cm

Orientador: Flávio Desessards De La Côte
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2017

1. Endocrinopatia 2. Síndrome Metabólica Equina 3.
Cavalo Crioulo 4. Resistência a insulina 5. Teste
dinâmico de glicose de milho via oral I. Desessards De La
Côte, Flávio II. Título.

Camila Cantarelli

**RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE E OCORRÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA
EQUINA EM CAVALOS CRIoulos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 16 de janeiro de 2017:

Flávio Desessards De La Corte, PhD (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Carla Bargi Belli, Dra. (FMVZ-USP)

Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Dr. (UFPel)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

À memória dos colegas e amigos que se tornaram nossos anjos da guarda, sendo lembrados sempre com muito carinho por quem os conheceu, Gustavo Vogt Cardoso, Jacob Francisco Thiele, Henrique Nemitz Martins e Ruan Pendeza Callegaro.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por guiar e abençoar o meu caminho.

Aos meus pais, Aldair Antonio e Marcia Rejane Cantarelli, e minhas irmãs, Juliana e Ana Lúcia Cantarelli, por serem o meu porto seguro, fontes de amor incondicional e apoio incessante. O meu sincero agradecimento também ao meu cunhado, Rodrigo Piccini, que se tornou o irmão mais velho que eu não tive.

Ao meu amado namorado, Bruno Pereira Trevisan, que apesar da distância frequente dos últimos anos, sempre se fez presente de uma forma ou de outra, me apoiando, incentivando e cuidando com muito amor e carinho.

Aos meus orientadores, Flávio Desessards de La Corte e Karin Erica Brass, pelas oportunidades que me concederam, pelos ensinamentos e pela amizade.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino e suporte para a obtenção deste título, bem como a CAPES e FATEC pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em especial à técnica administrativa Maria Moro da Rosa, por toda dedicação e auxílio prestado.

À colega e amiga Simone Stefanello, pelo apoio contínuo desde a graduação, por me abrir as portas do LABRUMEN e pela companhia e ajuda nas tardes de análises laboratoriais.

Aos meus colegas e também amigos, Stéfano Leite Dau e Marcos da Silva Azevedo pela disponibilidade e disposição em ajudar principalmente nas coletas de dados pelo estado rio-grandense, mas também no dia-a-dia de estudos, companhia e troca de experiências.

Aos queridos colegas Roberta Pereira, Grasiela De Bastiani, Miguel Gallio, Heloísa Palma, Gabriele Biavaschi, Diego Silva, Antônio Alcemar Beck Jr., Mariana Cocco e Liomara Amaral pela amizade, ensinamentos e por todos os bons momentos compartilhados, tornando essa jornada muito mais prazerosa.

Aos proprietários, veterinários e funcionários dos diversos locais em que foi desenvolvida essa pesquisa, pela confiança, disponibilidade e auxílio. Dedico um agradecimento especial aos funcionários da Estância da Carapuça, José, Teovani e Leonaldo pela cooperação e amizade desenvolvidos ao longo dos dias de experimento.

Enfim, sou grata a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento, me ajudaram na execução deste trabalho ou simplesmente torceram pelo meu sucesso.

Muito obrigada!

RESUMO

RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE E OCORRÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EQUINA EM CAVALOS CRIoulos

AUTORA: Camila Cantarelli
ORIENTADOR: Flávio Desessards De La Corte

Os cavalos da raça Crioula que antes eram mantidos soltos em campos nativos, passaram a ser criados em coqueiras ou pastagens com alimentação rica em energia. Essas mudanças resultaram no surgimento de problemas como as doenças ortopédicas do desenvolvimento e a obesidade. Atualmente, sabe-se que animais obesos estão mais predispostos a desenvolver a síndrome metabólica equina (SME), que se caracteriza pelo aumento da adiposidade corporal, resistência insulínica (RI) e laminite. Em vista disso e considerando a literatura escassa acerca do tema na raça, os objetivos deste trabalho foram investigar a SME em cavalos Crioulos considerados obesos e avaliar a aplicabilidade do teste dinâmico com glicose de milho via oral (TGO) para o seu diagnóstico. Vinte e dois cavalos Crioulos de diferentes propriedades do Rio Grande do Sul foram alocados em três grupos de acordo com seu escore de condição corporal (ECC) e presença ou ausência de laminite; G1 (6/22): $ECC < 7$ e tido como controle, G2 (8/22): $ECC \geq 7$ sem laminite e G3 (8/22): $ECC \geq 7$ com laminite. Histórico e exame clínico completo foram obtidos, seguidos de exame radiográfico dos cascos e mensuração ultrassonográfica da espessura do tecido adiposo subcutâneo na região da base da cola, cernelha, atrás da escápula e retroperitoneal. Medidas morfométricas, além do ECC e escore da crista do pescoço também foram determinadas. A avaliação da curva glicêmica foi realizada por meio do TGO após um jejum de oito horas, sendo coletadas amostras de sangue antes e aos 30, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos (min) da administração de glicose. A concentração plasmática de insulina foi mensurada na amostra basal, aos 75 min e ao pico de glicose. Os animais do G3 apresentaram as maiores medidas morfométricas e concentrações plasmáticas de insulina. Diferenças ($p < 0,05$) morfométricas e metabólicas foram observadas entre animais do G1 e os do G2 e G3. Em nove animais obesos (56,25%), o pico de glicose, bem como o pico de insulina em resposta ao TGO, ocorreu em tempo superior (120-180min) ao descrito na literatura (60-90min). Além disso, o tempo de retorno da glicose aos níveis basais foi diferente entre os grupos, caracterizando RI em 69% ($n=11/16$) dos animais obesos. A detecção da RI por meio do TGO somente foi possível porque a curva da resposta glicêmica ao teste foi determinada, uma vez que as concentrações plasmáticas de insulina se mantiveram dentro dos valores de referência. A gordura subcutânea da região da base da cola foi o fator mais fortemente correlacionado ($R=0,87$) com a RI. A amostragem de animais obesos aos 75 min, preconizada para detecção de hiperinsulinemia, foi considerada inadequada se realizada sem a curva glicêmica. Estes resultados revelam diferenças claras relacionadas com a obesidade nas respostas de glicose e insulina de cavalos Crioulos frente ao TGO, reforçando a associação dessa condição com distúrbios metabólicos. Além disso, aumentam a acurácia no diagnóstico da SME, permitindo sua identificação antes da ocorrência de laminite.

Palavras-chave: Endocrinopatia. Resistência insulínica. Glicose. Laminite.

ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN OBESITY AND OCCURRENCE OF EQUINE METABOLIC SYNDROME IN CRIOULO HORSES

AUTHOR: Camila Cantarelli
ADVISOR: Flávio Desessards De La Corte

The Crioulo horses that were kept on native grassland, are now being bred confined to box stalls, fed high carbohydrate diets or on high energy pastures. These changes resulted in obesity and developmental musculoskeletal problems. Today, it is known that overweight animals are more prone to develop equine metabolic syndrome (EMS). This clinical syndrome, in addition to being associated with increased adiposity, is also characterized by insulin resistance (IR) and laminitis. In view of this and considering the limited literature regarding this breed, the aim of this study was to investigate EMS in obese Crioulo horses, evaluating the applicability of an oral sugar test (OST) to its diagnosis. Twenty-two Crioulo horses from different properties of Rio Grande do Sul were allocated into three groups according to their body condition score (BCS) and presence or absence of laminitis as follows: CON or G1 (6/22), BCS < 7; OB or G2 (8/22), BCS ≥ 7 and LAM or G3 (8/22), BCS ≥ 7 with clinical and/or radiographic signs of laminitis. A complete clinical history and exam was obtained, followed by radiographic evaluation of front feet and by ultrasonography measurements of subcutaneous body fat on the rear of the rump, withers, behind the scapula and at retroperitoneal region. Morphometric measurements, BCS and cresty neck score (CNS) were also determined. For the OST, animals were fasted for eight hours overnight and blood samples were collected for glucose concentration before and 30, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 min after sugar administration. Insulin was determined on the basal sample, at 75 min and at the peak glucose. Horses from G3 presented the highest morphometric measurements and insulin plasma concentration among the groups. Morphometric and metabolic differences ($P < 0.05$) were observed between G1 animals and obese ones. In nine obese horses (56,25%), the glucose peak, as the insulin peak response to OST, occurred in a different time (120-180 min) from the one described in literature (60-90 min). Furthermore, delaying time to return to glucose baseline levels was observed in most obese horses characterizing IR in 69% ($n=11/16$). The detection of IR through the oral sugar test was only possible because the glycemic curve was performed, once the plasma insulin concentrations were within reference ranges. The subcutaneous fat ultrasound measurement at the tail-head showed the highest correlation ($R=0,87$) with IR. Sampling at 75 minutes, as preconized for hyperinsulinism detection, without monitoring of the plasma glucose curve, was considered inadequate for the obese animals. These results indicate that there are clear obesity related differences in the glucose and insulin responses of Crioulo horses to oral sugar test, reinforcing the association between this condition and metabolic disturbs. Results of this study increase the accuracy in the early diagnosis of this condition, allowing it to be identified before serious consequences such as laminitis occur.

Keywords: Endocrinopathy. Insulin resistance. Glucose. Laminitis.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figure 1 – Plasma glucose concentration (mean \pm SEM) measured using a portable human glucometer and laboratory colorimetric method from the horse groups during the oral sugar test. Significant differences were seen in the time for glucose peak and time to return to baseline. (a) Control, (b) obese and (c) obese with laminitis group. (*#) Different superscript symbols indicate significant differences between groups in the time of peak glucose (P<0.05).....43

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1 - Age and morphometric measurements (sample mean \pm SEM) of Crioulo horses with moderate body condition score (CON group; n=6), obese (OB group; n=8) and obese with laminitis (LAM group; n=8).....40

Table 2 – Ultrasound measurements of subcutaneous fat thickness (SFT) at four different sites and front feet radiograph measurements in groups of horses with moderate body condition score (CON group; n=6), obese (OB group; n=8) and obese with laminitis (LAM group; n=8)41

Table 3 – Basal plasma concentrations of triglyceride, glucose and insulin and oral sugar test (OST) results in groups of Crioulo horses with moderate body condition score (CON group; n=6), obese (OB group; n=8) and obese with laminitis (LAM group; n=8).....42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Síndrome Metabólica Equina (SME)	13
2.2 Cavalo Crioulo	16
3 ARTIGO	18
Abstract	20
1. Introduction	22
2. Materials and methods	23
3. Results	27
4. Discussion	29
References	34
4 CONCLUSÕES.....	44
5 REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o quarto maior rebanho equino do mundo, sendo o maior da América Latina (GUERRA, 2010). Somando equinos, muares e asininos são cerca de 8 milhões de cabeças, movimentando 7,3 bilhões de reais ao ano. Este segmento agropecuário é responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, ocupando posição de destaque na economia nacional (BRASIL, 2016). Segundo dados do IBGE, as raças nacionais perfazem 41% do plantel brasileiro e o cavalo Crioulo aparece em quarto lugar em número de equinos por raça, estando a maioria destes localizados no sul do país (DIAS, 2016). No ano de 2015, a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC) realizou cerca de 24 mil novos registros, totalizando 402.341 animais com representação em todos os estados brasileiros (LAITANO, 2016).

Ao longo dos últimos anos, devido à expansão e crescente valorização da raça, têm-se observado muitas mudanças na forma de criação destes animais, especialmente no que diz respeito à nutrição. Cavalos que antes eram mantidos soltos em campo nativo, passaram a ser criados em pastagens cultivadas ou confinados em cocheiras com alimentação rica em energia. Como o cavalo Crioulo se estabeleceu a partir de seleção natural, foram selecionados animais rústicos com um alto potencial de conversão alimentar, adaptados ao pasto nativo com pouco valor energético (ABCCC, 2014). As alterações de manejo citadas, aliadas a irregularidade da prática de exercício físico, resultaram no surgimento de alguns problemas, dentre eles a obesidade e as doenças ortopédicas do desenvolvimento.

Hoje se sabe que animais que mantêm um excessivo estado corporal (sobrepeso), por um período prolongado, estão mais predispostos a ter distúrbios metabólicos, entre eles a denominada síndrome metabólica equina (SME) (FRANK et al., 2010). Esse termo foi adotado para essa condição devido à semelhança com a síndrome metabólica observada em humanos (JOHNSON, 2002). Porém, diferente desta última na qual o fator mais importante é o aparecimento de doenças cardíacas e *diabetes mellitus* do tipo 2, em equinos, o desenvolvimento de laminite é a maior preocupação associada. Adicionalmente à laminite e à obesidade, que pode se apresentar de forma generalizada ou como acúmulos regionais de gordura, essa síndrome também é caracterizada pela diminuição de sensibilidade a insulina ou resistência à insulina (RI). O diagnóstico de RI pode ser realizado por meio de testes dinâmicos que visam detectar hiperinsulinemia ou uma resposta glicêmica ou insulinêmica anormal frente a um desafio com glicose e/ou insulina administradas por via intravenosa ou oral (FRANK et al., 2010).

Para que se possa atuar de forma eficiente na prevenção e tratamento desta enfermidade é imperativo que se tenha mais conhecimento sobre o problema. Diversos autores já demonstraram que ocorrem variações raciais e individuais na manifestação desta síndrome (GEOR et al., 2013; BAMFORD et al., 2014; McCUE et al., 2015). Neste sentido, considerando a alta prevalência de animais obesos e a escassez de dados relativos à SME em cavalos Crioulos, se buscou determinar sua ocorrência e características nesta raça, correlacionando parâmetros físicos e metabólicos com a detecção de resistência insulínica e verificando a aplicabilidade do teste dinâmico com glicose de milho via oral (SCHUVER et al., 2014) no diagnóstico deste distúrbio.

Observa-se que quando abordamos e discutimos um determinado assunto, isso não apenas gera informação científica relevante, como também leva os médicos veterinários atuantes na área a se interessarem mais pelo tema em questão. As pessoas envolvidas na criação e fomento desta raça devem ser conscientizadas de que excesso de peso e funcionalidade física são conceitos que não andam juntos. Por vezes, o desconhecimento de distúrbios metabólicos como o abordado nesta dissertação, faz com que muitos casos passem despercebidos até que já esteja instalada uma situação mais grave.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Síndrome Metabólica Equina (SME)

O termo Síndrome Metabólica Equina foi introduzido pela primeira vez na medicina veterinária em 2002, quando se propôs que obesidade, resistência insulínica (RI) e laminite seriam componentes de uma síndrome clínica reconhecida em cavalos e pôneis (JOHNSON, 2002). Dessa forma, em comparação com outras afecções que acometem a espécie equina, a SME ainda está em uma fase inicial de estudos e muito ainda deve ser esclarecido acerca do tema (FRANK et al., 2010). O nome SME foi adotado para essa condição devido à semelhança com a síndrome metabólica (SMH) observada em humanos, mas diferente desta última na qual o fator mais importante é a afecção do sistema cardiovascular, em equinos, o desenvolvimento de laminite é a doença de maior interesse (ERTELT et al., 2014). Segundo Karikoski et al. (2011) e Morgan et al. (2015), mais de 70% dos cavalos apresentando laminite como seu primeiro sinal clínico, a desenvolveram como consequência de uma doença endócrina, mais comumente a SME.

2.1.1 Apresentação clínica

Adiposidade regional, obesidade, claudicação bilateral atribuída à laminite e/ou evidências de laminite prévia como a presença de anéis de crescimento divergentes no casco, são os principais sinais clínicos associados à SME (FRANK et al., 2010). Cavalos afetados costumam apresentar um escore de condição corporal (ECC) de 7 a 9 em uma escala de 1 (pobre) a 9 (extremamente obeso) desenvolvida por Henneke et al. (1983) e marcada expansão da crista do pescoço (FRANK, 2011). Carter et al. (2009) criaram um escore para quantificar essa forma de adiposidade regional no pescoço (ECP), usando uma escala de 0 a 5. Escores de 3 ou mais são normalmente detectados em cavalos ou pôneis com SME (FRANK, 2011). A circunferência do pescoço também pode ser medida dividindo a distância da nuca até a cernelha por quatro e medindo a circunferência do pescoço em três pontos equidistantes (25%, 50% e 75%) (FRANK et al., 2006). A relação entre a circunferência do pescoço na sua distância média (50%) e a altura medida na região da cernelha foi usada para prever o desenvolvimento de laminite associada ao pastoreio em pôneis (GEOR, 2008). Essas medidas também podem ser usadas para avaliar o progresso após a implantação de planos de dieta e exercício (FRANK et al., 2006). Geor et al. (2013) sugerem que aspectos do fenótipo de SME em pôneis podem ficar latentes no período em que esses animais estão expostos à uma dieta com baixo teor de

carboidratos hidrossolúveis. Porém, podem se tornar aparentes quando a ingestão desses carboidratos aumenta.

2.1.2 Fisiopatologia: adiposidade, resistência insulínica e laminite

SME é um distúrbio complexo cuja compreensão ainda é limitada (McCUE et al., 2015; MORGAN et al., 2015). Apesar de apresentar como componentes principais a obesidade, RI e laminite, essa condição parece abranger muitos outros aspectos que afetam o metabolismo energético, perturbam a função dos adipócitos, promovem trombose, induzem a inflamação e o estresse oxidativo e também alteram a função das células endoteliais vasculares (ERTELT et al., 2014; BAMFORD et al., 2015).

Fatores ambientais como dieta, nível de atividade física e estação do ano, e fatores intrínsecos, como genética, afetam a massa de gordura corporal. Os mecanismos implicados na obesidade generalizada ou na adiposidade regional na SME são pouco conhecidos (McCUE et al., 2015). No entanto, a alimentação em excesso por tempo prolongado associada à uma atividade física limitada parece ser um fator contribuinte (FRANK et al., 2010). Adicionalmente, cavalos e pôneis com SME parecem possuir uma eficiência metabólica aprimorada com respeito ao aproveitamento da energia da dieta (TREIBER et al., 2006; McCUE et al., 2015). Nesse contexto, foi sugerido que cavalos e pôneis evolutivamente adaptados para sobreviver em ambientes nutricionalmente pobres são especialmente predispostos à obesidade e RI quando submetidos às condições modernas de manejo, nas quais alimentação abundante é disponibilizada o ano inteiro (GEOR et al., 2013; MORGAN et al., 2014; McCUE et al., 2015).

Acredita-se que mudanças sazonais na sensibilidade à insulina podem ocorrer, refletindo alterações na disponibilidade de alimento, constituição do alimento disponível, atividade física e condição corporal (VICK et al., 2006; GEOR et al., 2013). Contudo, considerando que com a domesticação e manejo atual, muitos equinos experimentam um estado crônico de superalimentação, acredita-se que essas mudanças sazonais na condição corporal e sensibilidade à insulina são substituídas por obesidade e RI progressiva com os respectivos efeitos adversos associados. Conforme Frank et al. (2010) e McCue et al. (2015), mais pesquisas são necessárias para identificar os determinantes genéticos de eficiência metabólica em cavalos e o efeito de fatores ambientais, como a supernutrição, na expressão destes genes.

O tecido adiposo não é mais conhecido como sendo apenas um órgão de armazenamento energético, mas também um componente endócrino que produz muitos hormônios, conhecidos como adipocinas (leptina, resistina, adiponectina, etc) (RASOULI & KERN,

2008; BAMFORD et al., 2015). Essas adipocinas inflamatórias podem levar a um ciclo vicioso de reforço da inflamação do tecido adiposo, síntese de adipocinas e a síntese de proteínas de fase aguda secundária pelo fígado (FRANK & TRADOS, 2014). Esse processo é bem conhecido em humanos, nos quais a obesidade é caracterizada por um estado de inflamação crônica de baixa intensidade (RASOULI & KERN, 2008).

A obesidade também tem sido associada à diminuição da sensibilidade a insulina em cavalos e pôneis (GENTRY et al., 2002; FRANK et al., 2006; TREIBER et al., 2006; VICK et al., 2006), embora alguns cavalos obesos possuam essa sensibilidade normal (McCUE et al., 2015). Não se sabe se é a obesidade que induz RI ou se é o cavalo resistente à insulina que é mais predisposto à obesidade (FRANK et al., 2010). Existem duas teorias primárias ligando a obesidade a RI: 1) a sub-regulação de vias de sinalização de insulina induzida por adipocinas e citocinas produzidas no tecido adiposo; e 2) lipotoxicidade, o acúmulo de lípidios intracelulares no tecido sensível à insulina, tais como o músculo esquelético e fígado (FRANK, 2011).

Quanto a laminite, sabe-se até o presente momento que RI e/ou hiperinsulinemia predis põem pôneis à laminite associada ao pastoreio e que a condição pode ser induzida experimentalmente pela infusão de quantidades suprafisiológicas de insulina via intravenosa durante mais que dois a três dias (TREIBER et al., 2006; ASPLIN et al., 2007). Mecanismos potenciais relacionando a obesidade, hiperinsulinemia e RI com a laminite, são amplamente constatados. Esses mecanismos incluem disfunção das células endoteliais dos vasos sanguíneos (JANSSON, 2007), vasoconstrição digital (SARAFIDIS & BAKRIS, 2007) e captação de glicose insuficiente pelas células epidérmicas laminares (FRENCH & POLLITT, 2004). Para Frank et al. (2010), as ações vasoregulatorias da insulina representam uma relação plausível entre RI e laminite na espécie equina.

2.1.3 Diagnóstico

A SME pode ser diagnosticada obtendo-se um histórico completo do animal, realizando um exame físico, investigando alterações radiográficas no casco e conduzindo testes laboratoriais (FRANK, 2011). O exame físico deve incluir a avaliação da adiposidade regional, estabelecendo-se o ECC (HENNEKE et al., 1983) e o ECP (CARTER et al., 2009). Embora as pesquisas estejam focadas em estabelecer um teste com coleta única de amostra de sangue capaz de rastrear a RI, os testes dinâmicos ainda são necessários para avaliar adequadamente a sensibilidade a insulina (SMITH et al., 2015).

A hiperglicemia raramente é detectada já que a maioria dos animais com SME é capaz de manter uma resposta compensatória de secreção de insulina eficaz frente a RI (FRANK et al., 2010). No entanto, muitas vezes são detectadas concentrações de glicose no sangue próximas ao limiar superior do intervalo de referência, indicando uma perda parcial do controle glicêmico (FRANK et al., 2010; BRASS et al., 2012). Já a hiperinsulinemia, na ausência de fatores como estresse, dor ou alimentação recente, fornece evidência de RI (FRANK & TADROS, 2014). Amostras sanguíneas devem ser colhidas após pelo menos seis horas de jejum e concentrações basais de insulina de até 20 μ U/ml são esperadas em cavalos e pôneis saudáveis. No entanto, este valor não está aumentado em todos os animais com SME, reforçando o conceito de que testes dinâmicos fornecem um diagnóstico mais acurado (FRANK et al., 2010).

Os testes dinâmicos consideram a curva glicêmica e concentrações insulínicas após o controle glicêmico ser desafiado por indução de hiperglicemia (MORGAN et al., 2015). Diversos testes podem ser usados com este propósito e embora um teste ideal para diagnosticar RI em cavalos ainda não tenha sido estabelecido (SMITH et al., 2015), o teste de glicose oral com xarope de milho (TGO) (SCHUVER et al., 2010) tem sido recomendado para uso clínico a campo, pela sua praticidade. De acordo com a literatura que aborda esse teste (FRANK, 2011; SHUVER et al., 2014; SMITH et al., 2015), concentrações de insulina superiores a 60 μ U/ml entre 60 e 90 minutos após a indução de hiperglicemia, indicam resistência insulínica. Em um estudo comparativo entre o TGO e o teste combinado de tolerância a glicose e insulina via intravenosa (TTGIV), desenvolvido por Eiler et al. (2005) e considerado padrão nas pesquisas, foi observada uma correlação muito próxima, tanto em cavalos com SME, como naqueles do grupo controle (SHUVER et al., 2014).

2.2 Cavalo Crioulo

Os números do ano de 2015 comprovam que a raça Crioula continua crescendo e se consolidando em todo o país (LAITANO, 2016). A manada de animais cresceu 6,4% em relação ao ano de 2014, chegando a um plantel de 402.341 equinos em todo o território brasileiro. Segundo depoimento do presidente da ABCCC, José Luiz Lima Laitano, este crescimento se deve ao aumento da exposição da raça em eventos nas regiões de fomento, com destaque em provas e exposições nacionais e internacionais, resultado de grandes investimentos na criação, treinamento e comercialização de exemplares. Dados divulgados pela ABCCC mostram que as vendas no ano de 2014 chegaram a R\$ 198 milhões ante os 183,1 milhões de 2013, atin-

gindo novo recorde na raça Crioula. No ciclo de 2014, mais de 20,6 mil animais participaram de 624 eventos promovidos e incentivados pela ABCCC (LAITANO, 2015).

O cavalo Crioulo tem sua origem nos cavalos Andaluz e Jacas espanhóis, trazidos da península Ibérica no século XVI pelos colonizadores. Estabelecidos na América, principalmente na Argentina, Chile, Uruguai, Paraguai, Peru e sul do Brasil, muitos desses animais passaram a viver livres, formando manadas selvagens que, durante cerca de quatro séculos, enfrentaram temperaturas extremas e condições adversas de alimentação. Essas adversidades imprimiram nestes animais algumas de suas características mais marcantes: rusticidade e resistência. Em meados do século XIX, fazendeiros do sul do continente começaram a tomar consciência da importância e da qualidade dos cavalos que vagavam por suas terras. Esta nova raça, bem definida e com características próprias, passou a ser preservada, vindo a ganhar notoriedade mundial a partir do século XX, quando a seleção técnica exaltou o seu valor e comprovou suas virtudes (ABCCC, 2014).

Na raça Crioula, a SME foi documentada pela primeira vez em 2012 (BRASS et al., 2012). Porém, nesse estudo com casuística hospitalar, não se observou diferença entre as características físicas de 6 cavalos com laminite associada à resistência insulínica e o grupo controle composto por 5 animais saudáveis. Em outro estudo que abordou a laminite crônica em 9 cavalos Crioulos, a resistência insulínica foi identificada como a causa predisponente mais comum, afetando 4 animais, seguida de endotoxemia (um caso). Nos 4 casos restantes, não foi possível determinar a causa da laminite (SILVA et al., 2013). Paz et al. (2013) demonstraram que a obesidade interferiu na relação espacial da falange distal com o estojo córneo, indicando que os animais obesos dessa raça estariam mais propensos a desenvolver laminite. No entanto, foi utilizada apenas uma única coleta para mensuração plasmática de insulina, sem realização de um teste dinâmico, e não foi possível relacionar os achados radiográficos com RI.

3 ARTIGO

**Evaluation of oral sugar test response for detection of equine metabolic syndrome in
obese Crioulo horses**

Camila Cantarelli, Flávio Desessards de La Côte

Artigo submetido para publicação
Periódico: Domestic Animal Endocrinology

1 (Title Page – Original Article)

2

3 **Evaluation of oral sugar test response for detection of equine metabolic syndrome in**
4 **obese Crioulo horses**

5

6 C. Cantarelli^{a,*}, S.L. Dau^a, S. Stefanello^a, M.S. Azevedo^b, K.E. Brass^c, F.D. De La Côte^c

7

8 ^a*Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Ma-*
9 *ria, 1000 Roraima Av., Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil.*

10 ^b*Coordenadoria Especial de Biociências e Saúde Única, Universidade Federal de Santa Ca-*
11 *tarina, Adv. Sebastião Calomeno Av., Curitibanos, 89520-000, SC, Brazil.*

12 ^c*Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, 1000*
13 *Roraima Av., Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil.*

14

15 * Corresponding author. Tel.: +55 55 99969 0463

16 *E-mail address:* camilacantarelli@yahoo.com.br (C. Cantarelli).

17 Abstract

18 Due to the high prevalence of obesity in Crioulo horses, information allowing early diag-
19 nosis of equine metabolic syndrome (EMS) and especially towards preventing the associated
20 laminitis is of great value. The aim of the present study was to investigate the occurrence of
21 EMS and the response to an oral sugar test (OST) in obese Crioulo horses. Twenty-two
22 Crioulo horses were allocated into three groups according to their body condition score (BCS)
23 and presence or absence of laminitis as follows: CON or G1 (6/22), BCS<7; OB or G2 (8/22),
24 BCS \geq 7 and LAM or G3 (8/22), BCS \geq 7 with clinical and/or radiographic signs of laminitis.
25 A complete clinical history and exam was obtained, followed by radiographic evaluation of
26 front feet and by ultrasonography measurements of subcutaneous body fat on the rear of the
27 rump, withers, behind the scapula and at retroperitoneal region. Morphometric measurements,
28 BCS and cresty neck score (CNS) were also determined. For the OST, animals were fasted for
29 eight hours overnight and blood samples were collect for glucose concentration before and 30,
30 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 min after sugar administration. Insulin was determined
31 on the basal sample, at 75 min and at the peak glucose. Horses from G3 presented the highest
32 morphometric measurements and insulin plasma concentration among the groups. Morpho-
33 metric and metabolic differences ($P < 0.05$) were observed between G1 animals and obese
34 ones. The subcutaneous fat ultrasound measurement at the tail-head showed the highest corre-
35 lation with insulin resistance. The mean peak glucose response for OST occurred at 67 (\pm 3)
36 min, 122 (\pm 21) min and at 132 (\pm 12) min for horses from G1, G2 and G3 respectively. A de-
37 lay on the time to return to glucose baseline levels was observed in most obese horses charac-
38 terizing insulin resistance. Therefore, sampling at 75 min for measurement of insulin re-
39 sistance in obese groups without glycemic curve follow-up was considered inadequate. Insu-
40 lin resistance detection was possible through the OST only because the glycemic response

41 curve to the test was measured. These results indicate that there are clear obesity related dif-
42 ferences in the glucose and insulin responses of Crioulo horses to oral sugar test.

43

44 *Keywords:* Endocrinopathy; Obesity; Subcutaneous fat; Insulin; Glucose; Laminitis.

45 **1. Introduction**

46 Endocrine disorders associated with obesity have been reported as one of the leading
47 causes of laminitis in horses [1]. More than 70% of horses having laminitis as the first clinical
48 sign [2,3] developed it as consequence of endocrine diseases, being the equine metabolic syn-
49 drome (EMS) most commonly reported [3]. In addition to laminitis and obesity, which may
50 be present in a generalized form or as regional fat accumulation, this syndrome is also charac-
51 terized by decreased insulin sensitivity [4].

52 Over the last few years, due to the increasing appreciation and economic value of the
53 Crioulo horse, many changes have been observed in the management of these animals, espe-
54 cially regarding to the nutrition. These horses formerly running free on native grassland, are
55 now being bred and kept confined to box stalls, fed with high carbohydrate diets or on high
56 energy pastures. As this breed evolved from natural selection, animals with enhanced meta-
57 bolic efficiency, adapted to the low energetic native pasture, were selected [5]. The manage-
58 ment changes mentioned above, along with irregular practice of exercise, resulted in obesity
59 and developmental musculoskeletal problems [6].

60 The Crioulo horse derives from the so-called "Spanish horse", originating from Anda-
61 lusian and Jaca Navarra spanish horses, brought from the Iberian Peninsula in the sixteenth
62 century by settlers [5]. Andalusian horses are considered predisposed to EMS due their phe-
63 notype [7,8]. It is also recognized that EMS occurs most commonly in ponies and certain
64 breeds of horses (Morgans, Paso Finos, Arabians, Saddlebreds, Quarter horses and Tennessee
65 Walking horses) [9]. Considering this information, in addition with the Crioulo's tendency
66 towards obesity and the proposed genetic basis of the EMS phenotype [10], it is reasonable to
67 assume that this breed is potentially predisposed to EMS.

68 EMS can be diagnosed by investigating the animal history, performing a complete
69 physical examination, taking radiographs of the feet and conducting laboratory tests [9]. The

70 physical examination should include a regional adiposity evaluation, taking into account the
71 body condition score (BCS) [11] and the cresty neck score (CNS) [12]. Objective methods for
72 evaluation of adiposity include morphometric [12,13,14,15] and ultrasonographic [16,17,18]
73 measurements. Considering that animals with EMS may have resting glucose and insulin con-
74 centration within the reference range, the diagnosis of insulin resistance (IR) may be per-
75 formed through a dynamic test to detect hyperinsulinemia and/or abnormal glycemc and in-
76 sulinemic responses using oral or intravenous (IV) glucose or insulin challenges [4]. Several
77 tests may be used for this purpose [19,20,21,22], and although an ideal test to diagnose IR in
78 horses has not yet been established [4], the oral sugar test with corn syrup (OST) [21] has
79 been recommended for clinical use in the field, due to its practicality [9].

80 Although researches are looking for a single physical parameter as well as a single
81 blood sample result associated with the occurrence of EMS or identification of individuals at
82 risk, the great variability in the results influenced by the environment and inherent to physio-
83 logical factors (such as age, breed and gender) make it a complex challenge. In view of this
84 associated with the scarce literature regarding to Crioulo breed, the aim of this study was to
85 investigate EMS in obese Crioulo horses, considering morphometric and metabolic parame-
86 ters and examining the glucose and insulin responses to an oral sugar test.

87

88 **2. Materials and methods**

89 *2.1 Animals and inclusion criteria*

90 Twenty-two Crioulo horses, 20 non-pregnant mares, and 2 geldings used for different
91 purposes, from different farms of the Rio Grande do Sul state, Brazil, and registered at the
92 Brazilian Crioulo Horse Breeders Association (ABCCC) were included in the study. Initially,
93 a complete medical and management history was obtained and a clinical examination per-
94 formed. Horses were allocated into three groups according to their body condition score

95 (BCS) and presence or absence of laminitis. The first group included six (6/22) non-obese
96 animals, 10 ± 1 years of age (range, 6 to 15 years) and weighing 454 ± 33 kg (range, 410 to
97 483 kg), with a BCS of 5.4 ± 0.3 . These horses were used as control group (CON group).
98 Obesity was the main criteria used as the inclusion factor for the other two groups, and was
99 defined as a BCS ≥ 7 out of 9 [9,11]. Eight obese mares without laminitis, 9 ± 1 years old
100 (range, 4 to 15 years), weighing 513 ± 14 kg of body weight (range, 450 to 563 kg) were in-
101 cluded in the second group (OB group), considered the risk group for EMS. The last group
102 (LAM group) included obese horses suffering from laminitis, 7 ± 1 years old (range, 4 to 13
103 years) and 517 ± 18 kg body weight (range, 448 to 608 kg). Horses had no history of systemic
104 disease within the previous last months or clinical signs of pituitary *pars intermedia* dysfunc-
105 tion. Laminitis on the last group was attributed to EMS, with an insidious presentation not
106 related to episodes of intense physical effort, colic, diarrhea or a severe uterine infection.
107 When they were submitted to the oral sugar tolerance test, LAM group had foot pain under
108 control (heart rate not exceeding 40 b.p.m), with an Obel grade 2 lameness or lower [23]. All
109 procedures were approved by the Committee on Animal Use of the Federal University of San-
110 ta Maria Ethics (CEUA number 4243050416) and signed owner consent was obtained for all
111 horses used in this study.

112

113 2.2 Morphometric study

114 Bodyweight (BW), height at the withers (height), thoracic circumference (TC), neck
115 length, neck crest height (NCH), and neck circumference at 25% (N 25), 50% (N 50) and
116 75% (N 75) of the neck length were measured in centimeters using a metric measuring tape.
117 Neck length was measured from the poll to the highest point of the withers [13]. Crest height
118 was measured at 50% of neck length and to differentiate the crest (tissue apparent above the
119 *ligamentum nuchae*) from the neck muscles, palpation and visual assessment were performed

120 [12]. All measurements were taken while the neck was held in a relaxed position, approxi-
121 mately at a 45° angle. Three experienced veterinary evaluators rated body condition score
122 (BCS) from 1 to 9 [11] and cresty neck score (CNS) from 0 to 5 [12]. Scores were rated to the
123 nearest whole- or half-score increment and the median of each horse's scores was used for
124 data analysis.

125

126 *2.3 Diagnostic imaging and interpretation*

127 In order to objectively evaluate the subcutaneous fat thickness (SFT), ultrasound
128 measurements were taken at four different sites using a 7.5-MHz linear transducer. Site one
129 and two were located approximately 5 cm lateral from the midline on the left side; the first
130 was on the flat area on the rear of the rump approximately 7.6 cm cranial to the tail-head and
131 the second site was at the withers [16]. Site three was located immediately behind the scapula
132 (shoulder SFT) on the left side, approximately 25 cm lateral to the dorsal midline. The last
133 site was the area immediately caudal to the xiphoid process and lateral to the midline (retro-
134 peritoneal fat), with the probe in a parallel position to the ventral midline, as previously de-
135 scribed [24].

136 Radiographic studies of the front feet were done on the day before the oral sugar test
137 (OST) using lateromedial (LM) and dorsopalmar/plantar (DP) projections with the horse
138 standing on a square flat wooden block. Measurements were obtained from digital images
139 using dedicated softwares (eFilm Workstation®, IBM Company, and Image J, IJ 1.46r, public
140 domain) that allowed calibration of the linear measurement tool. The following parameters
141 were measured: distance between dorsal surfaces of the third phalanx (P3) and the hoof wall
142 in the proximal third (HP1) of the hoof wall, and the same distance in the distal third (HP2),
143 angle of the dorsal surface of the hoof wall and the ground (AHG), angle between the dorsal
144 surface of the P3 and the ground (APG), distance between the P3 extensor process and the

145 initial appearance of the coronet (PC) and distance between the solar surface of P3 and the
146 ground on the lateral and medial aspect (DP projection). The angle between the dorsal surface
147 of P3 and the hoof, angle of rotation (AR), were obtained by subtracting AHG from APG
148 [25].

149 More than confirming the diagnosis of laminitis and guiding patient treatment (LAM
150 group), radiograph measurements were used to assess the position of P3 within the hoof cap-
151 sule, correlating this finding with BCS and IR.

152

153 *2.4 Blood sampling and oral sugar test*

154 Horses undergoing OST were fasted approximately 8 hours (one flake of alfalfa hay
155 after 10 PM) before starting the test, as previously described [9,21]. At 7 AM, an IV catheter
156 was placed in the left jugular vein. Baseline blood samples were obtained at time 0 h (7:45
157 AM) and analyzed for glucose, insulin and triglycerides. A 45 min interval between the two
158 procedures was performed to avoid interference of stress at measured plasma concentrations.
159 The OST was started at 8 AM with oral administration of corn syrup (Yoki, General Mills
160 Brazil Food Ltda.) at 0.15 ml/kg [21]. Blood samples for glucose measurement were obtained
161 at 30, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 min after carbohydrate administration. At each
162 time point, 3 mL of blood were drawn from the indwelling catheter and discarded. A 5 mL
163 blood sample was collected, followed by infusion of 5 mL of heparinized saline solution.
164 Blood was analyzed immediately using a human handheld glucometer (G-Tech, SD Biosensor
165 Inc., Republic of Korea) to monitor serum glucose concentration and another fraction of
166 blood was transferred into blood tubes containing fluoride oxalate for laboratory glucose
167 analysis. If the return to the basal glucose values occurred after 240 min, the collection time
168 was extended until glucose concentration returned to baseline. Area under the glucose curve
169 (AUC_g) was determined. Blood samples for insulin measurements were collected at 75 min

170 [9,21] and at other times (120, 150, 180 min) on animals where the glucose peak was detected
171 beyond 90 min by the glucometer. Blood samples for insulin concentration measurements
172 were collected into plain tubes and allowed to clot at 37°C for at least 20 min. Within 30 min,
173 all samples were centrifuged (3.000 x g) for 10 min and plasma was stored at -20°C until la-
174 boratory analysis. Serum insulin concentration was measured by a RIA kit (Coat-A-Count;
175 Siemens Diagnostics) and serum glucose and triglycerides by colorimetric assays (K082, Bio-
176 clin, Brazil and TRIG 2, Siemens Diagnostics, respectively). All samples were measured in
177 duplicate, and both insulin and glucose assays have been previously validated for its use in
178 horses [26].

179

180 *2.5 Statistical analysis*

181 Quantitative variables were described using mean, SEM and range (minimum
182 and maximum). The groups were compared by one-way ANOVA and Tukey's Multiple
183 Comparison test for parametric data. Spearman or Pearson coefficients were calculated to
184 evaluate correlation between qualitative or quantitative variables, respectively. Significance
185 was defined as $P < 0.05$. A commercial statistical software (GraphPad Prism 5.04, Informer
186 Technologies Inc.) was used.

187

188 **3. Results**

189 *3.1 Clinical findings and morphometric characteristics*

190 Regional adiposity, bilateral lameness attributable to laminitis and/or evidence of di-
191 vergent growth rings on the hooves were some of the clinical findings in the eight animals of
192 LAM group. Laminitis was associated with EMS in all animals of this group. In addition,
193 laminitis episodes were recognized while horses were on abundant pastures (5/8) or confined
194 to box stalls receiving high carbohydrate diets (3/8) during spring (5/8), winter (1/8) or sum-

195 mer (2/8). The others two groups were clinically healthy and lameness-free at the time of
196 physical examination, excluding the obesity condition in the OB group.

197 Age and morphometric measurement data of the three groups are presented in Table 1.
198 The non-significant differences between height ($P = 0.6070$) and age ($P = 0.4256$) were ex-
199 pected in the studied animals since they were under the same breed standards and the control
200 and obese groups were selected to match (approximately) in age with the LAM group. The
201 LAM group showed the highest measurements between the three groups, with similar mor-
202 phometric characteristics to the OB group. Strong correlation of BCS with CNS ($P < 0.0001$, r
203 $= 0.8629$) and NC height ($P < 0.0001$, $r = 0.7247$) was observed. BCS was also positively
204 correlated with BW ($P = 0.0006$, $r = 0.6415$), N 25 ($P = 0.0012$, $r = 0.6844$), N 75 ($P =$
205 0.0015 , $r = 0.6740$) and N 50 ($P = 0.0075$, $r = 0.5787$). No differences between groups were
206 found on neck circumference at 25 and 50% of neck length.

207

208 *3.2 Ultrasound and radiographic measurements*

209 Subcutaneous fat thickness ultrasound measurements from the three groups are pre-
210 sented in Table 2. The amount of fat depot behind the scapula was the criteria most correlated
211 with BCS ($P < 0.0001$, $r = 0.8438$), showing greater difference between the obese animals and
212 CON group. The LAM group presented greater fat deposition in the tail-head region and this
213 depot was strongly correlated with IR ($P = 0.0002$, $r = 0.8561$). Although withers SFT was
214 more pronounced in obese animals, it was not correlated with IR. Retroperitoneal fat did not
215 differ between any groups and was not correlated with BCS or IR.

216 Radiographic measurement data are represented in Table 2. As expected, there were
217 differences between radiographic measurements of horses with laminitis and the other two
218 groups ($P = 0.0007$). No difference was observed between CON and OB group.

219

220 3.3 *Insulin and glucose response to oral sugar test*

221 Hyperglycemia and/or hyperinsulinemia were not detected at the baseline measure-
222 ment. All animals presented resting insulin and glucose concentrations within their respective
223 reference ranges [9]; however, LAM group horses had relatively higher basal insulin concen-
224 trations (Table 3). No differences were detected in baseline glucose and peak glucose between
225 groups. Dyslipidemia and increased AUC_g were observed in OB and LAM groups. Although
226 triglycerides were higher in obese animals, they did not differ between OB and LAM group
227 and were not correlated with IR. Considering the previously defined criteria of insulin con-
228 centration $>60\mu\text{IU/ml}$ at 75 min for OST [9], none of the studied animals demonstrated to
229 have IR. Insulin measurement performed at other time points in some animals where peak
230 glucose occurred later, showed significantly higher insulin values compared to the 75 min
231 sample, proving that peak insulin occurred in response to higher glucose levels. In the control
232 group, the elapsed time between the glucose peak and the return to baseline averaged 75
233 minutes, whereas in the obese groups 120 to 150 min were required. The OST glucose curve
234 of all three groups is represented in Figure 1. The commercial handheld human glucometer
235 showed relatively similar glucose values when later measured at the laboratory. Despite the
236 fact that compatibility between both was reduced when glucose values were higher, both
237 techniques agreed with the time to maximum concentration of glucose.

238

239 **4. Discussion**

240 The Crioulo breed is evolutionarily adapted to survive in poor environmental condi-
241 tions from the nutritional point of view, so that when subjected to modern management condi-
242 tions, where abundant food of good quality is available all year around, animals tend to de-
243 velop obesity and may also develop IR [10,27]. Overfeeding, associated with limited physical
244 activity seems to be a major contributing factor to EMS [1,10] and was observed in the LAM

245 group of the present study. Natural adaptive seasonal changes in appetite, metabolic energy
246 requirements and feeding behavior persist under domestic conditions [10,27] and it was sug-
247 gested [27] that the metabolic drives which promote survival in the natural state, render these
248 animals unsuited to standard domestic nutritional management. It's necessary to optimize
249 health and body condition. In other words, domestic handling should be fitted to match en-
250 dogenous requirements in conjunction with careful monitoring of body fat accumulation.

251 Clinical signs observed in animals of the LAM group were consistent with those de-
252 scribed in the EMS consensus statement [4]. The animals BCS in the present study correlated
253 positively with CNS and NC height, indicating that the deposit of fat surrounding the nuchal
254 ligament in the neck is common in obese Crioulo horses as described in other breeds [12,18].
255 This fat tissue was also the regional adiposity most correlated with EMS [4,9,12] and a CNS \geq
256 3 was present in most of the affected animals [4,12], such as observed in the present study.

257 Testing for insulin dysregulation may aid to the identification of individuals at in-
258 creased risk of pasture-associated laminitis and EMS [4,28]. The resting insulin and glucose
259 concentrations within the reference range, as observed in this study, were supported by other
260 studies; basal insulin or/and glucose concentration are not increased in all insulin-resistant
261 animals and can be affected by age, breed, exercise, stress, disease, feeding and diet [4,10,29].
262 Thus, dynamic testing like the OST performed in this study has been recommended [4,9,21].
263 Regardless of this concept, it may be necessary to develop breed-specific reference ranges,
264 once significant high basal insulin concentrations were detected in the LAM group in compar-
265 ison to control animals.

266 While the results of a frequently sampled IV glucose tolerance test [30] or a hyperin-
267 sulinaemic-euglycaemic clamp [19] are considered to be the gold-standard techniques for
268 identifying insulin dysregulation in a research and hospital environment [9], an easy, accurate
269 test for diagnosis of equine insulin dysregulation in the field practice remains to be estab-

270 lished [31]. The administration of oral water-soluble carbohydrate and measurement of insulin
271 response after 60-90 min has been suggested to be an effective indirect method of estimating
272 the insulin responsiveness in horses [9,21]. However, the results of the present study disagree
273 with the universal concept about the ideal time to measure insulin in EMS suspected horses,
274 since the glucose peak in many obese animals occurred between 120-180 min after corn syrup
275 administration. This sampling time for insulin maximum concentration has never been de-
276 scribed for OST. The authors believe that this time difference may not have been considered
277 previously because most experiments involved healthy, non-obese animals [17]. Although,
278 different peak times of glucose [7] and insulin concentrations [18] were also observed in An-
279 dalusian horses. Therefore, test adaptations, like the ones performed in the present study, re-
280 quire further investigation.

281 Handheld glucometers are easily operated and allow quick patient-side clinical deci-
282 sion making. Additional advantages include frequent monitoring, and decrease in both cost
283 and time of analysis when compared with standard laboratory methods assays [32]. Human
284 glucometers assume a constant stable relationship between plasma and whole blood and bal-
285 ance between plasma and erythrocyte glucose concentrations [33]. These relationships do not
286 apply universally to veterinary species and underlie the inherent inaccuracy of human glu-
287 cometers in veterinary medicine [34] as seen in the present study, where most values of the
288 glucometer were higher than those obtained in the laboratory (Fig. 1). A portable veterinarian
289 glucometer has been developed and has improved accuracy and precision within acceptable
290 statistical values [35]. Unfortunately, this equipment is not yet widely available in some coun-
291 tries, i.e. Brazil, and has a higher importation cost. Despite the variation observed between the
292 results of each of the two methods, the human portable glucometer was very helpful for im-
293 mediate check of glucose concentrations, allowing peak glucose identification and correct

294 insulin sampling time along the glucose curve. Furthermore, without it, would not be possible
295 to know for how long the glucose curve should be continued.

296 Comparison of the OST with the IV insulin tolerance test found that AUC_g for the
297 OST correlated significantly with the slope of maximal reduction in blood glucose concentra-
298 tion in the IV insulin tolerance test [20,21]. So although a maximum value for the return of
299 glucose to baseline concentrations was not set for the OST, according to these results, there
300 was an insulin resistance behavior in glucose concentration curves of three animals (37,5%)
301 from OB group and seven (87,5%) from LAM group. This may indicate that some animals of
302 the OB group also had insulin dysregulation and could be at imminent laminitis risk. This
303 delay to return to baseline glucose concentration was not observed in any of the control ani-
304 mals.

305 The EMS was first documented in Crioulo horses in 2012 [36]. In that study there was
306 no significant difference between the physical characteristics of 6 horses with laminitis asso-
307 ciated with insulin resistance and the control group of 5 healthy animals. Insulin values also
308 remained within the reference range in the horses of this study and insulin resistance was as-
309 sessed by the glucose curve behavior of the combined glucose-insulin test. In another study
310 that addressed chronic laminitis in 9 hospitalized Crioulo horses, insulin resistance was identi-
311 fied as the most common predisposing cause, affecting 4 animals [37]. Other investigation
312 demonstrated that obesity interfered in the spatial relationship of the distal phalanx with the
313 hoof capsule, indicating that obese animals of this breed would be more likely to develop lam-
314 initis [38]. However, a correlation with insulin resistance had not been established. It must be
315 considered that the method used by these researchers, a single collection for plasma meas-
316 urement of insulin, without performing a dynamic test, is not considered the most effective
317 means of IR identification [4]. In the present study, it was not possible to confirm, based on
318 radiographic measurements, that horses from OB group were more predisposed to develop

319 laminitis than horses from CON group, since no differences were observed between these
320 groups.

321 The limitations of this study cannot be ignored and include a variability of clinical
322 laminitis cases; horses from different locations, different times of exposure to the manage-
323 ment practices and feeding source. Due to the high prevalence of obesity in the Crioulo breed,
324 information that allows early diagnosis of EMS and especially helps prevention of the associ-
325 ated laminitis will be of great value.

326 In conclusion, results showed that EMS is a current problem in Crioulo horses and an-
327 imals with an excessive BCS should be closely monitored for detection of IR and consequent
328 laminitis. The tail-head fat accumulation seems to be the most suitable location to objectively
329 access fat deposition associated with EMS in Crioulo horses. Oral sugar test may not be sensi-
330 tive if only insulin measurements are performed. The glucose peak and consequently the insu-
331 lin peak in most obese Crioulo horses were delayed compared to animals with moderate BCS.
332 Animals at risk and with clinical signs of EMS can be mistakenly diagnosed as not having
333 EMS if insulin is sampled at 75min. Possibly, a new time-point measurement for insulin
334 should be determined for these animals. Insulin resistance was diagnosed by monitoring the
335 glucose curve using a handheld human glucometer or standard laboratory chemistry.

336

337 **Acknowledgments**

338 The authors would like to thank the owners, veterinarians and employees from all the places
339 where this research was performed, for the trust, availability and assistance. There are no
340 competing interests for any of the authors. Study sponsored by the UFSM-FATEC [grant
341 number 5.03.0025] and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
342 (CAPES).

343

344 **References**

345

346 [1] Morgan R, Keen J, McGowan C. Equine metabolic syndrome. *Vet Rec* 2015;177:173-179.347 [2] Donaldson MT, Jorgensen AJR, Beech J. Evaluation of suspected pituitary pars interme-
348 dia dysfunction in horses with laminitis. *J Am Vet Med Assoc* 2004;224:1123–1127.349 [3] Karikoski NP, Horn I, McGowan TW, McGowan CM. The prevalence of endocrinopathic
350 laminitis among horses presented for laminitis at a first-opinion/referral equine hospital.
351 *Domest Anim Endocrinol* 2011;41:111-117.352 [4] Frank N, Geor RJ, Bailey SR, Durham AE, Johnson PJ. Equine metabolic syndrome. *J*
353 *Vet Intern Med* 2010;24:467– 475.354 [5] Brazilian Association of Crioulo Horse Breeders (ABCCC). Breeders manual. Pelotas,
355 2014;7-9.356 [6] Gallio M, Azevedo MS, Brass KE, De La Corte FD, Lopes LD. Prevalência de alterações
357 ósseas no tarso de potros Crioulos de até vinte e seis meses de idade. *Ciência Rural*
358 2014;44:1442-1447.359 [7] Bamford NJ, Potter SJ, Harris PA, Bailey SR. Breed differences in insulin sensitivity and
360 insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score.
361 *Domest Anim Endocrinol* 2013;47:101–7.362 [8] Riber C, Rubio MD, Marquez F, Pinedo M, Munoz A, Castejon F. Hematological changes
363 observed in Andalusian horses with laminitis. *J Vet Med Sci* 1995;57:981–4.364 [9] Frank N. Equine metabolic syndrome. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011;27, 73-92.

- 365 [10] McCue ME, Geor RJ, Schultz N. Equine metabolic syndrome: a complex disease influ-
366 enced by genetics and the environment. *J. Equine Vet. Sci.* 2015;35:367-375.
- 367 [11] Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between condition score,
368 physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet J* 1983;15:371–2.
- 369 [12] Carter RA, Geor RJ, Burton Staniar W, Cubitt TA, Harris PA. Apparent adiposity as-
370 sessed by standardized scoring systems and morphometric measurements in horses and po-
371 nies. *Vet J* 2009;179:204–210.
- 372 [13] Frank N, Elliott SB, Brandt LE, Keisler DH. Physical characteristics, blood hormone
373 concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *J Am*
374 *Vet Med Assoc* 2006;228:1383–90.
- 375 [14] Carter RA, Treiber KH, Geor RJ, Douglass L, Harris PA. Prediction of incipient pasture-
376 associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localized
377 obesity in a cohort of ponies. *Equine Vet J* 2009;41:171–178.
- 378 [15] Wray H, Elliott J, Bailey SR, Harris PA, Menzies-Gow NJ. Plasma concentrations of
379 inflammatory markers in previously laminitic ponies. *Equine Vet J* 2013;45:546–51.
- 380 [16] Gentry LR, Thompson DL Jr., Gentry GT Jr., Del Vecchio RP, Davis KA, Del Vecchio
381 PM. The relationship between body condition score and ultrasonic fat measurements in mares
382 of high versus low body condition. *J Equine Vet Sci* 2004;24:198-203.
- 383 [17] Selim S, Elo K, Jaakkola S, Karikoski N, Boston R, Reilas T, Särkijärvi S, Saastamoinen
384 M, Kokkonen T. Relationships among body condition, insulin resistance and subcutaneous
385 adipose tissue gene expression during the grazing season in mares. *PLoS One*
386 2015;10:e0125968.

- 387 [18] Martin-Gimenez T, de Blas I, Aguilera-Tejero E, Diez de Castro E, Aguirre-Pascasio
388 CN. Endocrine, morphometric, and ultrasonographic characterization of neck adiposity in
389 Andalusian horses. *Domest Anim Endocrinol* 2016;56:57-62.
- 390 [19] Firshman AM, Valberg SJ. Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in
391 horses. *Equine Vet J* 2007;39:567-575.
- 392 [20] Eiler H, Frank N, Andrews FM, Oliver JW, Fecteau KA. Physiologic assessment of
393 blood glucose homeostasis via combined intravenous glucose and insulin testing in horses.
394 *Am J Vet Res* 2005;66:1598-1604.
- 395 [21] Schuver A, Frank N, Chameroy K, Elliott SB. Use of an oral sugar test to assess insulin
396 sensitivity in healthy and insulin-resistant horses. *J Vet Internal Med* 2010;24:780.
- 397 [22] Lindåse S, Nostell K, Askerfelt I, Bröjer, J. A modified oral sugar test for evaluation of
398 insulin and glucose dynamics in horses. *Acta Vet Scand* 2015;57:O4.
- 399 [23] Obel N. Studies on the histopathology of acute laminitis (dissertation). Uppsala, Sweden:
400 Almqvists & Wiksells Boktryckeri AB; 1948.
- 401 [24] Dugdale AHA, Curtis GC, Cripps P, Harris PA, Argo CM. Effect of dietary restriction
402 on body condition, composition and welfare of overweight and obese pony mares. *Equine Vet*
403 *J.* 2010;42:600-610.
- 404 [25] Belknap JK, Parks A. Lameness in the extremities. In: Baxter GM, ed. *Adams &*
405 *Stashak's Lameness in Horses*. 6th ed. Wiley-Blackwell, 2011:540–545.
- 406 [26] Borer-Weir KE, Bailey SR, Menzies-Gow NJ, Harris, PA, Elliott J. Evaluation of a
407 commercially available radioimmunoassay and species-specific ELISAs for measurement of
408 high concentrations of insulin in equine serum. *Am J Vet Res* 2012;73:1596-1602.

- 409 [27] Dugdale AHA, Curtis GC, Cripps PJ, Harris PA, Argo CM. Effects of season and body
410 condition on appetite, body mass and body composition in ad libitum fed pony mares. *Vet J*
411 2011;190,329-337.
- 412 [28] Borer KE, Bailey SR, Menzies-Gow NJ, Harris PA, Elliott J. Use of proxy measurements
413 of insulin sensitivity and insulin secretory response to distinguish between normal and previ-
414 ously laminitic ponies. *Equine Vet J* 2011;44,444-448.
- 415 [29] Pratt SE, Geor RJ, McCutcheon LJ. Effects of dietary energy source and physical condi-
416 tioning on insulin sensitivity and glucose tolerance in Standardbred horses. *Equine Vet. J.*
417 2006;38,579-584.
- 418 [30] Mehring JS, Tyznik WJ. Equine glucose tolerance. *J. Anim. Sci.* 1970; 30, 764-766.
- 419 [31] Smith S, Harris PA, Menzies-Gow N.J. Comparison of the in-feed glucose test and the
420 oral sugar test. *Equine Vet. J.* 2015;48,224-227.
- 421 [32] Clarke SF, Foster JR. A history of blood glucose meters and their role in self-
422 monitoring of diabetes mellitus. *Brit J Biom Sci* 2012 2012;69,83-93.
- 423 [33] Heath DF, Rose JG. The distribution of glucose and [14C] glucose between erythrocytes
424 and plasma in the rat. *Biochem J* 1969;112:373-377.
- 425 [34] Johnson BM, Fry MM, Flatland B, Kirk CA. Comparison of a human portable blood
426 glucose meter, veterinary portable blood glucose meter, and automated chemistry analyzer for
427 measurement of blood glucose concentrations in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2009;235,1309-
428 1313.
- 429 [35] Hackett ES, McCue PM. Evaluation of a veterinary glucometer for use in horses. *J Vet*
430 *Intern Med* 2010;24,617-621.

- 431 [36] Brass, K.E., De La Corte, F.D., Gallio, M., Gomes, R.M. (2012) Síndrome Metabólica
432 Equina em cavalos crioulos; 2012 ABRAVEQ Annual Convention Abstracts Program 41,
433 214-215.
- 434 [37] Silva GB, De La Corte FD, Brass KE, Fialho SS, Pereira RCF. Laminite crônica em
435 equídeos da raça Crioula: características clínicas e radiográficas. *Ciência Rural* 2013;43:2025-
436 2030.
- 437 [38] Paz, CFR, Paganela, JC, dos Santos CA, Nogueira CEW, Faleiros RR. Relação entre
438 obesidade, insulina plasmática e posicionamento da falange distal em equinos da raça Crioula.
439 *Arq Bras Med Vet Zoot* 2013;65:1699-1705.

440 **Table 1** – Age and morphometric measurements (sample mean \pm SEM) of Crioulo horses
 441 with moderate body condition score (CON group; n=6), obese (OB group; n=8) and obese
 442 with laminitis (LAM group; n=8).

Variable	Group			P value
	CON	OB	LAM	
Age (years)	10 \pm 1.4	9 \pm 1.4	7 \pm 1	P=0.4256
Height (cm)	141 \pm 0.8	142 \pm 1.3	141 \pm 1	P=0.6070
BW (kg)	454 \pm 10 ^b	513 \pm 14 ^a	517 \pm 18 ^a	P=0.0219
BCS (1 to 9 scale)	5.4 \pm 0.3 ^b	7.4 \pm 0.2 ^a	7.7 \pm 0.2 ^a	P<0.0001
CNS (0 to 5 scale)	2 \pm 0.1 ^b	3 \pm 0.2 ^a	3.4 \pm 0.2 ^a	P=0.0002
NC height (cm)	7.5 \pm 0.5 ^b	10.4 \pm 0.7 ^a	11.2 \pm 0.3 ^a	P=0.0013
N 25 (cm)	61.4 \pm 8.1	72.3 \pm 4.4	77.5 \pm 2.3	P=0.1210
N 50 (cm)	88.4 \pm 1.3	99 \pm 3.4	98 \pm 3.9	P=0.0712
N 75 (cm)	103 \pm 1.3 ^b	111.5 \pm 1.2 ^a	111.2 \pm 2.8 ^a	P=0.0248

443 BW, body weight; BCS, body condition score; CNS, cresty neck score; NC, neck crest; N 25,
 444 N 50, N 75, neck circumference at 25, 50 and 75% of neck length, respectively. Different
 445 superscript letters in the row indicate differences between groups (P<0.05).

446 **Table 2** – Ultrasound measurements (mean \pm SEM) of subcutaneous fat thickness (SFT) at
 447 four different sites and front feet radiograph measurements in Crioulo horses with moderate
 448 body condition score (CON group; n=6), obese (OB group; n=8) and obese with laminitis
 449 (LAM group; n=8).

Variable	Group			P value
	CON	OB	LAM	
Ultrasound measures (cm)				
Tail-head SFT	1 \pm 0.2 ^b	2.1 \pm 0.2 ^a	2.6 \pm 0.3 ^a	P=0.0037
Withers SFT	0.2 \pm 0.04 ^b	0.6 \pm 0.18 ^a	0.6 \pm 0.06 ^a	P=0.0086
Shoulder SFT	0.6 \pm 0.06 ^b	2.1 \pm 0.15 ^a	1.8 \pm 0.15 ^a	P<0.0001
Retroperitoneal fat	1.7 \pm 0.33	3.2 \pm 0.6	2 \pm 0.35	P=0.0850
Radiographic measures				
HP1 (mm)	14.3 \pm 0.6 ^b	15 \pm 0.6 ^b	18.5 \pm 0.7 ^a	P=0.0007
HP2 (mm)	14.2 \pm 0.06 ^b	14.5 \pm 0.06 ^b	22.2 \pm 0.14 ^a	P<0.0001
PC (mm)	12.4 \pm 0.07 ^b	12.7 \pm 0.06 ^b	19.6 \pm 0.2 ^a	P=0.0013
AR (degrees)	-0.93 \pm 0.34 ^b	-1.58 \pm 0.33 ^b	-5.2 \pm 1.03 ^a	P=0.0007

450 HP1, distance between dorsal surface of P3 and dorsal aspect of the hoof wall in the proximal
 451 third of the hoof wall, and HP2, the same distance in the distal third; PC, distance between the
 452 third phalanx extensor process and the initial appearance of the coronet; AR, angle of rotation.

453 **Table 3** – Basal plasma concentrations of triglyceride, glucose and insulin and oral sugar test
 454 (OST) results in groups of Crioulo horses with moderate body condition score (CON group;
 455 n=6), obese (OB group; n=8) and obese with laminitis (LAM group; n=8).

Variable	Group			P value
	CON	OB	LAM	
Triglyceride (mg/dL)				
Baseline	17.4 ± 1 ^b	42.8 ± 2.6 ^a	47.8 ± 3.1 ^a	P<0.0001
Plasma glucose (mg/dL)				
Baseline	87 ± 1.6	92 ± 2.2	90 ± 3.6	P=0.5985
Peak	108.5 ± 3.8	124 ± 7	118 ± 4.4	P= 0.1420
Tmax _g (min)	67 ± 3 ^b	122 ± 21 ^a	132 ± 12 ^a	P=0.0140
AUC _g (mg/dL/min)	826 ± 21 ^b	1059 ± 44 ^a	1135 ± 40 ^a	P=0.0063
Plasma insulin (mIU/mL)				
Baseline	2.2 ± 0.2 ^a	3.9 ± 0.2 ^a	9.5 ± 0.9 ^b	P<0.0001
75 min	6 ± 1	9.5 ± 2	18.5 ± 7	P= 0.2146
At peak glucose	6 ± 1 ^a	11.89 ± 1.6 ^a	30.5 ± 6 ^b	P=0.0016

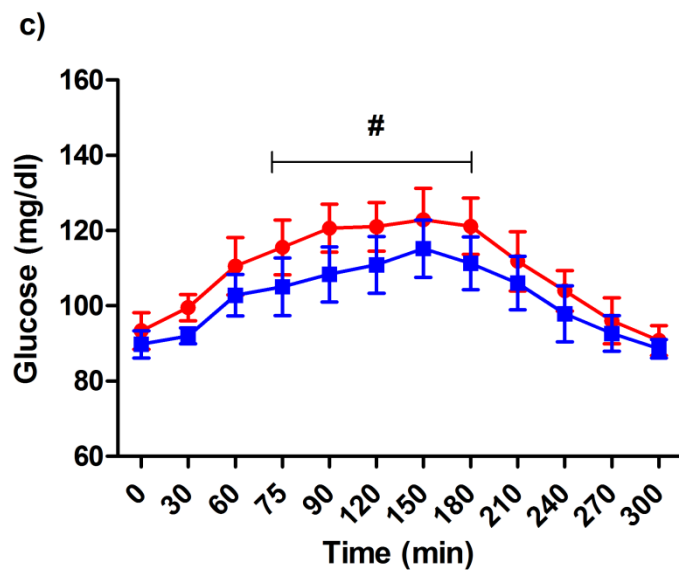
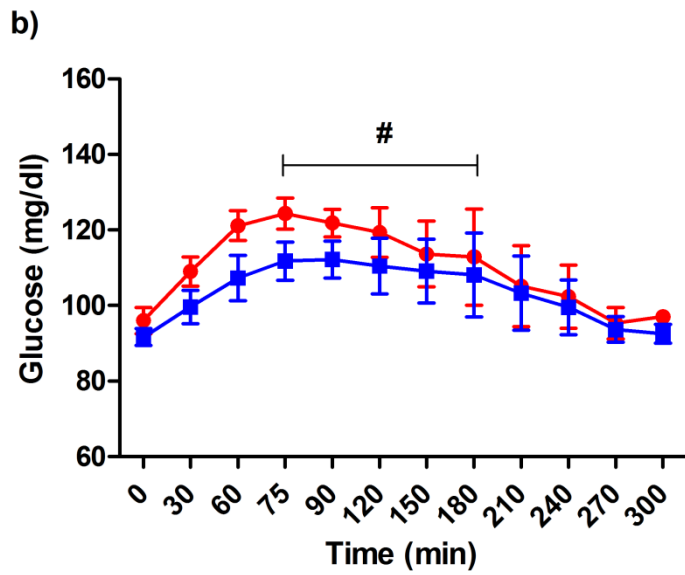
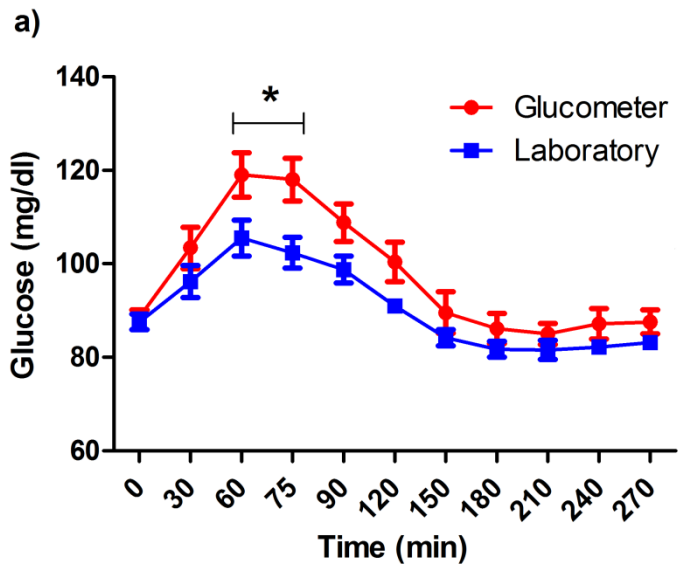
456 Tmax_g, time to maximal glucose concentration; AUC_g, area under the curve of glucose con-
 457 centration over time. Data are presented as mean ± SEM. Values with different superscript
 458 letters in the row indicate differences between groups (P<0.05).

(List of figures)

459

460

461 **Figure 1** – Plasma glucose concentration (mean \pm SEM) measured using a portable human
462 glucometer and laboratory colorimetric method from the horse groups during the oral sugar
463 test. Significant differences were seen in the time for glucose peak and time to return to base-
464 line. **(a)** Control, **(b)** obese and **(c)** obese with laminitis group. (*#) Different superscript
465 symbols indicate significant differences between groups in the time of peak glucose ($P < 0.05$).



4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho sugerem que animais obesos da raça crioula devem ser monitorados de perto para que seja possível estabelecer um diagnóstico precoce de indivíduos acometidos pela Síndrome Metabólica Equina e desta forma, tentar evitar o desenvolvimento de laminite. O teste de tolerância à glicose oral pode não ser sensível se apenas realizado com mensurações de insulina. O pico de glicose e, conseqüentemente, o pico de insulina ocorreu mais tardiamente na maioria dos cavalos Crioulo obesos, em comparação com os animais controle. Ou seja, o momento da segunda coleta para a insulina deve ser realizado de acordo com o pico de glicose para estes animais. Além disso, embora tanto a concentração plasmática basal, quanto a realizada no momento do pico de glicose, tenham permanecido dentro dos valores de referência fornecidos pela literatura, diferença estatística foi observada comparando-se animais controle e obesos. Portanto, acredita-se que o estabelecimento de intervalos de referência específicos para esta raça seja necessário, melhorando assim a acurácia no diagnóstico de hiperinsulinemia. A resistência à insulina pode ser detectada por meio de monitoramento da curva de glicose por um glicosímetro humano portátil e/ou pelo método laboratorial padrão.

5 REFERÊNCIAS

ASPLIN, K. E. et al. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. **The Veterinary Journal**, v.174, n.3, p.530-535, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307002377>>. Acesso em: 24 jan. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.003>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAVALOS CRIoulos (ABCCC). **Manual do Criador**. Pelotas, 2014. Disponível em: <<http://cavalocrioulo.org.br/admin/assets/upload/manuais/manual.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2015.

BAMFORD, N. J. et al. 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**, p.n/a-n/a. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/evj.12434>>. Acesso em: 15 out. 2015. doi: 10.1111/evj.12434.

BAMFORD, N.J. et al. 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, n.0, p.101-107, Nov. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724013001355>>. Acesso em: 23 jun. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.11.001>.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Plataforma online**. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

BRASS, K. E., et al. Síndrome Metabólica em Cavalos Crioulos. **Anais da XIII Conferência Anual da ABRAVEQ**, p.214-215, 2012.

CARTER, R. A., et al. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. **Veterinary Journal**, v.179, n.2, p.204-210, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109002330800110X>>. Acesso em: 24 abr. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.029>.

DIAS, Daniel. **Cavalos movimentam R\$16 bi por ano; Saiba como você pode lucrar**. **Canal Rural**, São Paulo, 22 mar. 2016. Disponível em: <<http://blogs.canalrural.com.br/danieldias/2016/03/22/o-agronegocio-equino-ja-movimentar-15-bi-por-ano-saiba-como-funciona-este-segmento-e-como-voce-pode-lucrar-com-cavalos/>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

EILER, H., et al. Physiologic assessment of blood glucose homeostasis via combined intravenous glucose and insulin testing in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, n.9, p.1598-1604, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1598>>. Acesso em: 23 jan. 2015. doi: 10.2460/ajvr.2005.66.1598.

ERTELT, A., et al. Metabolic syndrome: is equine disease comparable to what we know in humans? **Endocrine Connections**, v.3, n.3, p.R81-R93, 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4068110/>>. Acesso em: 03 jan. 2016. doi: 10.1530/ec-14-0038.

FRANK, N., et al. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.228, n.9, p.1383-1390, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2460/javma.228.9.1383>>. Acesso em: 25 jun. 2015. doi: 10.2460/javma.228.9.1383.

FRANK, N., et al. Equine Metabolic Syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, n.3, p.467-475, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0503.x>>. Acesso em: 03 abr. 2015. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0503.x.

FRANK, N. Equine Metabolic Syndrome. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.27, n.1, p.73-92, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074907391000115X>>. Acesso em: 25 jun. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2010.12.004>.

FRANK, N.; E. M. TADROS. Insulin dysregulation. **Equine Veterinary Journal**, v.46, n.1, p.103-112, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/evj.12169>>. Acesso em: 25 jun. 2015. doi: 10.1111/evj.12169.

FRENCH, K. R.; C. C. POLLITT. Equine laminitis: glucose deprivation and MMP activation induce dermo-epidermal separation in vitro. **Equine Veterinary Journal**, v.36, n.3, p.261-266, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2746/0425164044877170>>. Acesso em: 03 nov. 2015. doi: 10.2746/0425164044877170.

GENTRY, L. R., et al. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. **Journal of Animal Science**, v.80, n.10, p.2695-2703, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/2002.80102695x>>. Acesso em: 05 jun. 2015. doi: /2002.80102695x.

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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080608003468>>. Acesso em: 12 set. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2008.10.016>.

GEOR, R. J. et al. Current understanding of the equine metabolic syndrome phenotype. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, n.10, p.841-844, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080613005200>>. Acesso em: 20 jun. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2013.08.010>.

GUERRA, P. J. **Brasil tem o quarto maior rebanho equino do mundo, com 5,8 milhões de cabeça**. Brasília: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2010. Disponível em: <<http://www.cfmv.org.br/portal/noticia.php?cod=606>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

HENNEKE, D. R., et al. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.15, n.4, p.371-372, 1983. Dis-

ponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>>. Acesso em: 03 abr. 2015. doi: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x.

JANSSON, P. A. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. **Journal of Internal Medicine**, v.262, n.2, p.173-183, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01830.x>>. Acesso em: 03 jan. 2016. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01830.x.

JOHNSON, P. J. The equine metabolic syndrome: Peripheral Cushing's syndrome. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.18, n.2, p.271-293, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073902000068>>. Acesso em: 25 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0739\(02\)00006-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00006-8).

KARIKOSKI, N. P., et al. The prevalence of endocrinopathic laminitis among horses presented for laminitis at a first-opinion/referral equine hospital. **Domestic Animal Endocrinology**, v.41, n.3, p.111-117, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724011000737>>. Acesso em: 12 set. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.05.004>.

LAITANO, J. L. L. [Entrevista disponibilizada em 12 de fevereiro de 2015, a Internet]. 2015. Disponível em: <<http://estanciadaliberdade.com.br/index.php?secao=conteudo&mostraconteudo=329>>. Acesso em: 5 nov. 2015.

LAITANO, J. L. L. [Entrevista disponibilizada em 07 de janeiro de 2016, a Internet]. 2016. Disponível em: <<http://freiodeouro.canalrural.com.br/noticias/raca-crioula-cresce-64-no-pais-em-2015/>>. Acesso em: 02 dez. 2016.

MCCUE, M. E., et al. Equine Metabolic Syndrome: A complex disease influenced by genetics and the environment. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.35, n.5, p.367-375, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080615001434>>. Acesso em: 30 jun. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2015.03.004>.

MORGAN, R. A., et al. Prevalence and risk factors for hyperinsulinaemia in ponies in Queensland, Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.92, n.4, p.101-106, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/avj.12159>>. Acesso em: 03 jun. 2016. doi: 10.1111/avj.12159.

MORGAN, R., et al. Equine metabolic syndrome. **Veterinary Record**, v.177, n.7, p.173-179, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/evj.12445>>. Acesso em: 20 jun. 2016. doi: 10.1111/evj.12445.

PAZ, C. F. R., et al. Relação entre obesidade, insulina plasmática e posicionamento da falange distal em equinos da raça Crioula. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.1699-1705, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352013000600017&nrm=iso>. Acesso em: 27 nov. 2015.

RASOULI, N.; P. A. KERN. Adipocytokines and the Metabolic Complications of Obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, n.11 Suppl 1, p.S64-S73, 2008.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2585759/>>. Acesso em: 23 jan. 2015. doi: 10.1210/jc.2008-1613.

SARAFIDIS, P. A.; G. L. BAKRIS. Insulin and Endothelin: An Interplay Contributing to Hypertension Development? **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.92, n.2, p.379-385. 2007. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/jc.2006-1819>>. Acesso em: 03 jul. 2015. doi: doi:10.1210/jc.2006-1819.

SCHUVER, A., et al. Use of an oral sugar test to assess insulin sensitivity in healthy and insulin resistant horses [abstract]. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, n.3, p.780, 2010.

SCHUVER, A. et al. Assessment of insulin and glucose dynamics by using an oral sugar test in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, n.4, p.465-470, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2013.09.006>>. Acesso em: 03 abr. 2015. doi: 10.1016/j.jevs.2013.09.006.

SILVA, G. B., et al. Laminite crônica em equídeos da raça Crioula: características clínicas e radiográficas. **Ciência Rural**, v.43, n.11, p.2025-2030, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013001100017&nrm=iso>. Acesso em: 23 jun. 2014.

SMITH, S. et al. Comparison of the in-feed glucose test and the oral sugar test. **Equine Veterinary Journal**, p.n/a-n/a. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/evj.12413>>. Acesso em: 05 out. 2015. doi: 10.1111/evj.12413.

TREIBER, K. H., et al. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.228, n.10, p.1538-1545, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2460/javma.228.10.1538>>. Acesso em: 03 jan. 2014. doi: 10.2460/javma.228.10.1538.

VICK, M. M., et al. Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, n.6, p.609-617. 2006. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/paper/RD06016>>. Acesso em: 23 jan. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1071/RD06016>.