

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CINÉTICA DA CERULOPLASMINA E MARCADORES DO
METABOLISMO ÓSSEO NO PERIPARTO EM ÉGUAS DA RAÇA
CRIOULA E SEUS RESPECTIVOS POTROS**

TESE DE DOUTORADO

Lessana de Moura Gonçalves

Uruguaiana
2024

LESSANA DE MOURA GONÇALVES

**CINÉTICA DA CERULOPLASMINA E MARCADORES DO
METABOLISMO ÓSSEO NO PERIPARTO EM ÉGUAS DA RAÇA
CRIOULA E SEUS RESPECTIVOS POTROS**

Tese apresentada ao curso de doutorado
do Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal, da Universidade Federal do Pampa
(UNIPAMPA) como requisito para obtenção do
grau de Doutor em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Ciência Animal
Linha de Pesquisa: Produção Animal e
Reprodução

Orientador: Prof. Dr. Fábio Gallas Leivas

**Uruguaiana
2024**

G635c Gonçalves, Lessana de Moura

 Cinética da Ceruloplasmina e Marcadores do
Metabolismo Ósseo no Periparto Em Éguas da Raça Crioula
e seus Respectivos Potros/ Lessana de Moura Gonçalves.

 99 p.

 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Pampa,
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2024.

 "Orientação: Fábio Gallas Leivas".

 1. Metabolismo Equino. 2. Marcadores Moleculares em
Reprodução Animal. 3. Nutrição e Saúde Óssea em Potros.

 I. Título.

LESSANA DE MOURA GONÇALVES

**CINÉTICA DA CERULOPLASMINA E MARCADORES DO
METABOLISMO ÓSSEO NO PERIPARTO EM ÉGUAS DA RAÇA
CRIOULA E SEUS RESPECTIVOS POTROS**

Tese apresentada ao curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Ciência Animal
Linha de Pesquisa: Produção Animal e Reprodução

Tese defendida e aprovada em 25 de outubro de 2024.

Ranca examinadora
Documento assinado digitalmente
 **FABIO GALLAS LEIVAS**
Data: 13/01/2025 16:21:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas
UNIPAMPA

Prof. Dra. Bruna Curcio
UFPEL

Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira
UFPEL

Prof. Dra. Claudia Duarte
UNIPAMPA

Dr. Ricardo Pozzobon
UFSM

RESUMO

O Brasil possui o quarto maior rebanho equino do mundo, com 5.834.544 exemplares distribuídos por todo o território nacional, de acordo com o IBGE (2022). A equinocultura desempenha um papel importante na cadeia produtiva da agropecuária, além de ter relevância social significativa devido aos postos de trabalho que gera (MAPA, 2016). Com o crescimento econômico desse setor, torna-se crucial adotar um manejo sanitário, clínico e reprodutivo adequado, sendo esses fatores essenciais para o bom desempenho da cadeia produtiva. Entre os diversos aspectos desse manejo, a nutrição se destaca como um dos principais pilares, especialmente durante o período gestacional, que é fundamental para a produção de potros saudáveis. O ambiente uterino exerce uma função vital no desenvolvimento e na saúde do potro, influenciado diretamente pela nutrição da mãe. Tanto a má nutrição quanto a superalimentação da égua durante a gestação podem causar adaptações placentárias que impactam negativamente no crescimento fetal e no metabolismo do potro. Essas alterações podem levar a problemas de saúde a longo prazo, como resistência à insulina, desregulação metabólica e distúrbios ósseos, comprometendo o potencial atlético do animal. Dessa forma, garantir a nutrição adequada da égua é essencial para o sucesso do futuro potro. Este estudo teve como objetivo mensurar a atividade de marcadores moleculares do metabolismo energético (leptina e adiponectina) e proteínas de fase aguda (ceruloplasmina e soro amiloide A) em éguas no periparto, além dos mesmos marcadores nos potros, juntamente com a avaliação do metabolismo ósseo (Osteocalcina e Telopectídeo Carboxiterminal de Colágeno Tipo I- CTX-1) níveis de cobre e avaliação radiológica. As éguas foram divididas em dois grupos: o grupo 1 foi alimentado com silagem e ração, enquanto o grupo 2 foi alimentado exclusivamente com pastagem de campo nativo. Amostras de sangue foram coletadas 30 dias antes do parto e 7 dias após, tanto das éguas quanto dos potros (aos 7 dias de vida) para análise dos marcadores. Os potros foram avaliados radiologicamente aos 3 meses de idade. Os resultados mostraram que os níveis de Cp (ceruloplasmina) apresentavam-se altos antes do parto e diminuíram significativamente após o parto. Além disso, foi observada uma correlação entre os níveis de Cp e o manejo nutricional das éguas, com aquelas que apresentavam maior escore corporal demonstrando níveis mais elevados de Cp. A redução dos níveis de Cp após o parto foi associada ao aumento das concentrações de cobre nos potros, sugerindo que quanto maior a redução de Cp nas éguas após o parto, maior o teor de cobre nos potros. Adicionalmente, os resultados mostraram que os níveis de CTX-I aumentaram progressivamente entre 6 meses e 1 ano, indicando maior reabsorção óssea durante o desenvolvimento dos potros. O cobre também apresentou elevação

ao longo do tempo, possivelmente refletindo a maior demanda por colágeno durante o crescimento ósseo. Já a osteocalcina (Ocn) mostrou uma tendência de queda, sugerindo uma desaceleração na formação óssea à medida que os potros envelhecem. Em relação as avaliações radiológicas e os marcadores, os testes mostraram uma correlação significativa tanto com o número de alterações epifisárias quanto com o número total de alterações radiológicas. Isso sugere que níveis mais elevados de cobre estão associados a uma maior quantidade de alterações ósseas detectadas nos potros. Em contraste, os outros marcadores, CTX-I e Ocn, não apresentaram correlações estatisticamente significativas com as variáveis radiológicas analisadas. Esses achados reforçam a importância do manejo nutricional adequado e do monitoramento metabólico durante o parto e primeiros meses de vida, tanto para a saúde da égua quanto para o desenvolvimento saudável do potro.

Palavras-chave: equinos, gestação, alterações osteoarticulares, potros, marcadores moleculares.

ABSTRACT

Brazil has the fourth-largest equine population globally, with 5,834,544 horses distributed across the country, according to data from IBGE (2022). The equine industry plays a critical role in the agricultural production chain, while also contributing significantly to social development through the employment opportunities it generates (MAPA, 2016). As the economic importance of this sector continues to grow, it becomes essential to implement comprehensive health, clinical, and reproductive management practices, which are key to optimizing the productivity of the industry. Among these factors, nutrition stands out as a fundamental pillar, particularly during gestation, a crucial period for the development of healthy foals. The intrauterine environment exerts a profound influence on fetal growth and foal health, with maternal nutrition being a critical determinant. Both undernutrition and overnutrition in pregnant mares can lead to placental adaptations, which may adversely affect fetal growth and metabolic processes in the foal. Such disruptions can result in long-term health problems, including insulin resistance, metabolic disorders, and skeletal issues, which may ultimately compromise the animal's athletic potential. Thus, ensuring proper maternal nutrition is essential for the optimal development and performance of the foal. This study aimed to evaluate the activity of molecular markers related to energy metabolism (leptin and adiponectin) and acute-phase proteins (ceruloplasmin and serum amyloid A) in mares during the peripartum period. Additionally, the same markers were assessed in their foals, along with markers of bone metabolism (osteocalcin and C-terminal telopeptide of type I collagen - CTX-I), copper levels, and radiological evaluations. The mares were divided into two groups: Group 1 was fed a diet of silage and concentrate, while Group 2 received native pasture as their exclusive source of nutrition. Blood samples were collected from both the mares (30 days prepartum and 7 days postpartum) and the foals (at 7 days of age) to analyze the markers. Radiological assessments of the foals were conducted at 3 months of age. The results revealed that ceruloplasmin (Cp) levels were elevated before parturition and decreased significantly postpartum. Moreover, a correlation was found between Cp levels and the nutritional management of the mares, with those exhibiting higher body condition scores also showing elevated Cp levels. The reduction in Cp levels after parturition was associated with increased copper concentrations in the foals, suggesting that a greater postpartum decrease in maternal Cp levels corresponded with higher copper content in the foals. Additionally, CTX-I levels were found to increase progressively from 6 months to 1 year, indicating enhanced bone resorption during the foals' development. Copper levels also increased over time, likely reflecting a higher demand for collagen during

bone growth. Conversely, osteocalcin (Ocn) levels showed a declining trend, suggesting a slowdown in bone formation as the foals aged. Radiological assessments, when correlated with molecular markers, showed a significant association between elevated copper levels and a higher number of epiphyseal and radiological alterations in the foals. In contrast, no statistically significant correlations were observed between CTX-I and Ocn levels and the radiological variables analyzed. These findings emphasize the importance of appropriate nutritional management and metabolic monitoring during the peripartum period and early life, ensuring both the mare's health and the foal's proper skeletal and metabolic development.

Keywords: equine, gestation, osteoarticular changes, foals, molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama esquemático mostrando fatores ambientais que têm consequências no desenvolvimento do feto e recém-nascido com resultados subsequentes para seu fenótipo fisiológico na vida adulta. Imagem adaptada de Fowden, Giussani and Forhead, 2019..... 16

Figura 2- Evolução do metabolismo da égua durante a gestação. Alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios permitem que a égua atenda às necessidades do feto, mesmo em situações de disponibilidade reduzida de alimento. Imagem adaptada de Robles et al, 2021 18

Figura 3- Princípios da saúde e doença nos equinos. Imagem *adaptada de Robles et al, 2021* 20

Figura 4- Áreas palpáveis para a estimativa da gordura corporal e do escore de condição corporal. Adaptado de Henneke et al. (1983). 22

Figura 5- Medida da espessura da gordura de 0,43 cm (linha pontilhada rosa) e pele (linha pontilhada verde) de 0,25 cm. Essa medida de espessura de gordura foi compatível com um ECC moderado. ECC, escore de condição corporal. 23

Figura 6- Marcadores de renovação óssea liberados durante a fase de formação e reabsorção na remodelação óssea. (Adaptado de Shetty, et al.: Bone turnover markers) 29

ARTIGO 1

Figure 1- Ceruloplasmin concentrations in mares belonging to groups 1 and 2. 46

ARTIGO 2

Figura 1 - Valores de osteocalcina por idade em potros. 61

Figura 2 - Valores de cobre por idade em potros. 61

Figura 3 - Valores de CTX-I por idade em potros. 62

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 – Ceruloplasmin values recorded for mares (before and after parturition), feeding management type, body score, and ceruloplasmin level decrease (%) after parturition, as well as ceruloplasmin and copper levels in foals.	44
Table 2 – Pearson’s correlation coefficients.....	47

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1. Características Da Gestação.....	15
2.2. Programação No Desenvolvimento Do Fenótipo Fisiológico	15
2.3. Metabolismo Gestacional E Qualidade Fetal.....	16
2.3.1. Restrição Alimentar Gestacional E Consequências No Potro.....	18
2.3.2. Excesso De Peso Na Gestação	19
2.4. Avaliação Da Condição Corporal De Éguas Gestantes	21
2.4.1. Avaliação Subjetiva Do Escore Corporal.....	21
2.4.2. Avaliação Ultrassonográfica De Deposição De Tecido Adiposo	22
2.5. Biomarcadores Séricos	23
2.5.1. Biomarcadores De Metabolismo Energético.....	24
2.5.2. Biomarcadores De Inflamação	26
2.5.3. Biomarcadores De Metabolismo Ósseo	28
2.6. Desenvolvimento E Alterações Ósseas No Potro	31
2.6.1. Avaliação Radiológica De Potros	34
3. Objetivo	35
3.1. Objetivo Geral.....	35
3.2. Objetivos Específicos	35
4. Artigo 1.....	37
5. Introduction	40
6. Methods	41
6.1. Newborn Animals	42
6.2. Blood Samples Collection And Processing	42
6.3. Ceruloplasmin Level Determination.....	42
6.4. Copper Content Determination	42

7. Statistical Analysis	43
8. Results	43
9. Discussion.....	47
10. Conclusion.....	49
11. Declaration Of Conflict Of Interest	50
12. Acknowledgement	50
13. Author Contributions.....	50
14. Bioethics And Biosecurity Committee Approval.....	51
15. References	51
16. Artigo 2.....	55
17. Resumo	56
18. Introdução.....	58
19. Métodos	59
19.1. Análise Estatística.....	60
20. Resultados.....	60
21. Discussão	63
22. Conclusão	64
23. Referências Bibliográficas.....	65
24. Discussão Geral	78
25. Conclusão	81
26. Perspectivas Para O Estudo.....	82
27. Referencias Bibliográficas.....	83
28. Anexos.....	96

LISTA DE ABREVEATURAS

ECC	Escore de condição corporal
EGS	Espessura de gordura subcutânea
Ocn	Osteocalcina
CTX-!	Telopeptídeo de colágeno tipo I
PICP	Própeptídeo carboxiterminal do pro-colágeno tipo I
PINP	Propeptídeo Aminoterminal de pro-colágeno Tipo I
Hp	Haptoglobina
SAA	Soro Amiloide A
Cp	Ceruloplasmina
PFA	Proteína de fase aguda
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-6	Interleucina-6
IL-1	Interleucina-1
RI	Resistencia a Insulina
LOX	Lisil oxidase

1. INTRODUÇÃO

A gestação equina é um processo fisiológico que envolve mudanças significativas no metabolismo da égua para sustentar o desenvolvimento fetal adequado. Durante a gestação, a égua passa por adaptações metabólicas que incluem alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, sendo essas mudanças essenciais para garantir que o feto receba os nutrientes necessários, especialmente nos estágios finais da gestação (Robles et al., 2021). A nutrição adequada da égua ao longo desse período desempenha um papel crucial não apenas para a saúde materna, mas também para o crescimento e desenvolvimento saudável do potro (Robles & Palmer, 2019). Uma dieta balanceada em macro e micronutrientes, especialmente durante o último trimestre, é determinante para a qualidade nutricional do feto e para evitar complicações metabólicas futuras no potro (Fowden et al., 2019).

A pesquisa em biomarcadores vem sendo foco em medicina humana e veterinária ao longo dos anos, sendo os marcadores séricos uma forma não invasiva de avaliar e monitorar o metabolismo e funcionamento orgânico, dentre os quais se destacam as proteínas de fase aguda (PFAs), marcadores ósseos e de metabolismo.

PFAs são glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos que sofrem alteração de concentração em animais expostos a doenças internas e externas, assim como infecção, inflamação, trauma cirúrgico ou estresse ((Murata et al., 2004) . Esses marcadores são encontrados no soro em altas concentrações durante a instalação do processo inflamatório (Alsemgeest et al., 1993), podendo ser avaliadas em situações clínicas, pois se acredita que sejam melhores indicadores da resposta sistêmica ao processo inflamatório ou infeccioso do que outras variáveis, tais como febre, aumento no tempo de sedimentação de eritrócitos e leucocitose associada à neutrofilia (Horadagoda et al., 1999).

As proteínas de fase aguda podem ser classificadas como positivas ou negativas (Jerry Kaneko et al., 2008). As positivas são aquelas que apresentam um aumento na sua concentração na presença de estímulo inflamatório, e as negativas apresentam decréscimo na concentração na presença deste estímulo. Nas proteínas positivas, enquadram-se, dentre outras, a α 1-glicoproteína ácida, a haptoglobina (Takiguchi et al., 1990) e ceruloplasmina (Yoen et al., 201; Girardi et al., 2019a).

Dentre os marcadores de metabolismo energético temos a ação da leptina que é considerada importante no que diz respeito à obesidade, outro fator que é relevante nesse

aspecto é a secreção de insulina, ela é responsável pelo controle da glicemia e metabolismo das gorduras (Gomes et al., 2014). Para atuar no controle da glicose, a insulina capta a glicose plasmática em excesso e reabastece o glicogênio muscular, após a formação do glicogênio muscular, a glicose em excesso é enviada ao tecido adiposo (Romero & Zanesco, 2006). Dessa forma, Van de Sande-Lee & Velloso, 2012 afirmam que a insulina, assim como a leptina, tem função de regular o balanço energético.

Além destes marcadores a adiponectina tem sido fundamental dentre os marcadores de obesidade, sendo ela inversamente proporcional à adiposidade em cavalos pela sua correlação negativa, a função fisiológica primária da adiponectina é aumentar a sensibilidade à insulina, com diminuição das concentrações plasmáticas associada à resistência à insulina (Fang & Judd, 2018). Hotta et al., 2001, afirmaram que a expressão do RNAm da adiponectina diminui com o aumento da adiposidade. A expressão do gene da adiponectina é inibida pelo aumento da insulina, TNF- α e concentração de dexametasona em adipócitos (Fasshauer et al., 2002).

Debilidade em potros recém-nascidos é frequentemente associada a desregulação de fluidos, desequilíbrio ácido-básico e distúrbios eletrolíticos, endócrinos e orgânico (Toribio, 2011). Hipocalcemia, hiperfosfatemia, redução de vitamina D e concentrações elevadas de hormônio da paratireóide (PTH) são anormalidades frequentes associadas à gravidade da doença e mortalidade em potros críticos (Kamr et al., 2015). Estudos em outras espécies mostraram que em doenças críticas, o osso pode influenciar no metabolismo, hematopoiese e imunidade (Su et al., 2019).

Marcadores de formação óssea e de cartilagem são enzimas derivadas das células ósseas ou então são componentes da matriz óssea que são libertados na corrente sanguínea durante o processo de remodelação óssea (Price, 1998) através da ação dos osteoblastos e/ou osteoclastos e permitem fornecer medidas concretas e instantâneas da atividade das células ósseas (Jackson et al., 2003).

Em equinos têm sido estudado os seguintes marcadores ósseos séricos ou plasmáticos: osteocalcina (OCn), peptídeo carboxiterminal do pro-colágeno tipo I (PICP), fosfatase alcalina de especificidade óssea (FAO), deoxipiridinolina total (TDPyr), telopeptídeo carboxiterminal de colágeno tipo I (ICTP) e o telopeptídeo de colágeno tipo I (CTX-I) (Lepage, Carstanjen e Uebelhart, 2001).

Estudos recentes demonstraram que CTX-I e PTH elevados, juntamente com concentrações reduzidas de OCN e ALP, indicam que a reabsorção óssea é o processo de remodelação óssea predominante em potros recém-nascidos sépticos em estado crítico. A associação entre os marcadores da remodelação óssea com a gravidade da doença mostra que o

esqueleto tem papel importante na homeostase mineral, mas também pode refletir uma resposta esquelética à inflamação sistêmica que pode ter implicações imunológicas e metabólicas (Kamr et al., 2020a).

Por fim, o cobre é um mineral crítico no metabolismo ósseo e no desenvolvimento estrutural dos potros. A deficiência de cobre tem sido associada a problemas como osteocondrose e outras disfunções ósseas, tornando sua monitoração vital nos primeiros dias de vida (Stahl et al., 2024).

Weeren, van e Jeffcott, 2013 ao avaliarem OC nos últimos 20 anos salientam que há pouca esperança de eliminar a OC nos próximos 20 anos. Os progressos devem ser focados no conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares para reduzir o impacto na saúde e no bem-estar dos equinos.

A biologia molecular tem evoluído constantemente e suas metodologias estão se tornando cada vez mais precisas e exatas, além de representar hoje uma das áreas de maior potencial para a realização de pesquisas na área veterinária.

Deste modo este trabalho buscou avaliar marcadores moleculares em éguas no periparto e potros recém-nascidos da raça crioula, procurando modificações nos padrões gestacionais através de marcadores séricos e relacionando os efeitos nos respectivos potros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS DA GESTAÇÃO

O período gestacional em equinos para obtenção de um potro viável é de 320 a 390 dias sendo essa variação devido a alguns fatores, dentre eles, a raça (Panchal et al., 1995), no entanto, fatores ambientais, maternos e fetais podem influenciar o tempo de gestação (Davies Morel et al., 2002).

A placenta é um órgão transitório, responsável pelas trocas metabólicas entre mãe e concepto e pela secreção e produção de hormônios para manutenção da gestação. A placenta da égua é classificada como epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e adeciuada. A aderência placentária ocorre por volta dos dias 24 a 40, este tipo de placentação não é invasiva e produz uma mínima resposta celular materna (Prestes & Landim-Alvarenga, 2017), a placenta sustenta o feto no útero materno, induz a imunotolerância local prevenindo a rejeição do feto, fornece oxigênio e nutrientes oriundos do compartimento materno e descarta os dejetos fetais (Schuler et al., 2018).

O feto equino cresce linearmente durante a segunda metade da gestação e ganha 75% do seu peso de nascimento entre o meio e o final da gestação (Platt, 1984). As necessidades fetais de nutrientes para a acreção tecidual e o metabolismo oxidativo, portanto, aumentam rapidamente durante esse período à medida que a massa fetal aumenta. Isso drena significativamente os recursos nutricionais maternos e é acompanhado pelo aumento da resistência materna à insulina à medida que a gestação avança. Por sua vez, isso aumenta a disponibilidade de glicose materna para uso feto-placentário e está associado a mudanças ontogênicas nas taxas de metabolismo fetal e útero-placentário até o nascimento (A. L. Fowden et al., 2000). Mudanças no crescimento e desenvolvimento fetal induzidas por alterações no desenvolvimento placentário e na ingestão alimentar materna podem ter consequências para o potro por um longo tempo após o nascimento (Fowden et al., 2019).

2.2. PROGRAMAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DO FENÓTIPO FISIOLÓGICO

Alterações no fenótipo metabólico, cardiovascular e endócrino têm sido observadas em neonatos e potros jovens em resposta à desnutrição materna, composição dietética alterada e administração de glicocorticóides durante o final da gestação (Jellyman et al., 2015).

Em geral, os achados sugerem que, em comum com outras espécies, os estímulos ambientais durante o início da vida têm um papel importante na determinação do fenótipo fisiológico do cavalo. Estudos realizados até o momento destacam o final da gestação e o período neonatal imediato como pontos chave da programação do desenvolvimento do cavalo (Fig. 1), consistentes com a maturação estrutural e funcional dos tecidos próximos ao nascimento. No entanto, mais estudos são necessários para determinar a extensão e os mecanismos moleculares dessa programação, principalmente em cavalos mais velhos (Fowden et al., 2019).

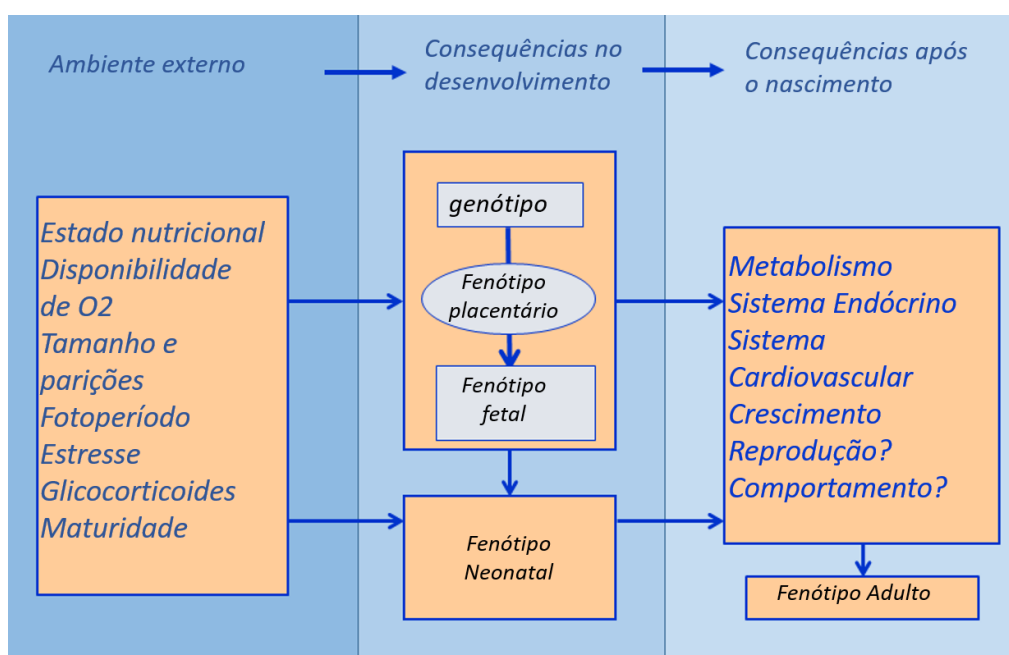


Figura 1- Diagrama esquemático mostrando fatores ambientais que têm consequências no desenvolvimento do feto e recém-nascido com resultados subsequentes para seu fenótipo fisiológico na vida adulta. Imagem adaptada de Fowden, Giussani and Forhead, 2019.

2.3. METABOLISMO GESTACIONAL E QUALIDADE FETAL

Estudos epidemiológicos em humanos e em animais mostram que ambientes subótimos no útero e durante o início da vida neonatal alteram o desenvolvimento e predisõem o indivíduo a problemas de saúde ao longo da vida. O conceito da origem de doenças nos adultos tornou-se bem aceito devido aos estudos em animais que definiram com precisão os resultados de exposições específicas, como restrição de nutrientes, superalimentação durante a gestação, estresse materno e glicocorticóides administrados exogenamente (Nathanielsz, 2006a).

Portanto, o monitoramento do padrão corporal de éguas gestantes é uma das formas de prevenir o aparecimento de alterações metabólicas no neonato.

Manter as necessidades nutricionais durante a gestação é fundamental para garantir o desenvolvimento saudável do feto e o sucesso reprodutivo. A gestação impõe um aumento significativo das exigências de energia e nutrientes, particularmente no último terço da gestação, quando o crescimento fetal é mais acelerado. Além disso, a qualidade da dieta, tanto em termos de energia quanto de proteínas, deve ser adequadamente balanceada para evitar efeitos adversos de desnutrição ou sobrealimentação, que podem impactar negativamente a saúde do potro ao nascimento e no longo prazo (Robles et al., 2021).

Durante a gestação, o metabolismo da égua sofre uma série de adaptações fisiológicas para garantir o suporte adequado ao crescimento fetal e às demandas energéticas da mãe (Fig. 2). Essas mudanças são particularmente notáveis à medida que a gestação avança, envolvendo o metabolismo de glicose, lipídios e proteínas.

Nos estágios iniciais da gestação, as éguas apresentam uma absorção de glicose mais eficiente, resultando em hiperinsulinemia basal e um aumento na secreção de insulina após as refeições (George et al., 2011). Isso ocorre porque a égua acumula reservas de glicose como gordura ou glicogênio nos tecidos periféricos, preparando-se para as crescentes demandas energéticas fetais (Robles et al., 2021). Esse fenômeno é denominado de anabolismo facilitado, onde o corpo da égua armazena nutrientes para utilização posterior (Freinkel N et al., 1974).

No final da gestação, as éguas tornam-se mais resistentes à insulina, o que resulta em uma diminuição na tolerância à glicose nos tecidos periféricos e uma menor sensibilidade das células beta pancreáticas (Fowden et al., 1980). Essas adaptações permitem que uma maior proporção de glicose seja direcionada para o feto, pois até 75% da glicose materna circulante é utilizada pelo útero e pelos tecidos fetais nessa fase (A.L. Fowden et al., 2000).

Além do metabolismo de glicose, também ocorre um aumento na mobilização de lipídios, refletido no aumento de ácidos graxos livres no plasma, como o ácido β -hidroxibutírico (Bazzano et al., 2014), que é utilizado como fonte alternativa de energia quando os níveis de glicose são baixos (Fukao et al., 2004). Essa mobilização de lipídios é crucial para atender às necessidades energéticas tanto da égua quanto do feto, especialmente nos estágios finais da gestação, quando a demanda por glicose atinge seu nível mais alto (Robles et al., 2021).

Essas mudanças no metabolismo de glicose e lipídios são complementadas pelas variações no metabolismo de proteínas, com o aumento das necessidades de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento fetal (Robles et al., 2021). As concentrações de ureia no plasma aumentam no final da gestação, indicando uma maior utilização de aminoácidos para processos anabólicos (Bazzano et al., 2014).

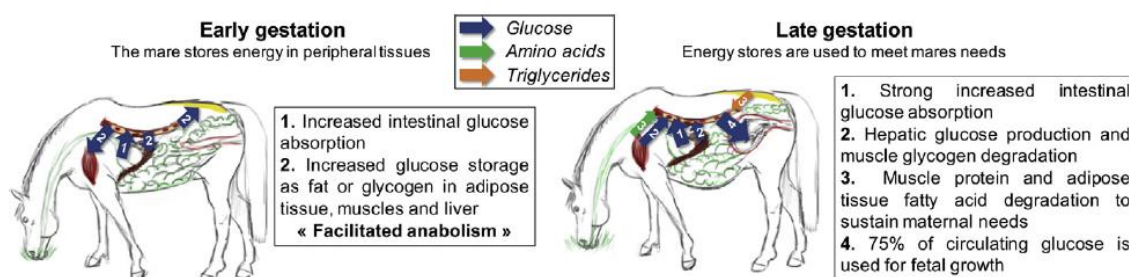


Figura 2- Evolução do metabolismo da égua durante a gestação.

Alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios permitem que a égua atenda às necessidades do feto, mesmo em situações de disponibilidade reduzida de alimento. Imagem adaptada de Robles et al, 2021

Essa evolução metabólica ao longo da gestação é crucial para garantir o crescimento saudável do feto, ao mesmo tempo que preserva as reservas energéticas da égua para sustentar o parto e a lactação.

A desnutrição materna durante toda a gestação ou por períodos discretos da gestação demonstrou afetar adversamente a tolerância à glicose, a função endócrina pancreática e a sensibilidade à insulina (Ousey et al., 2008). Por outro lado, a obesidade pode levar à diminuição da sensibilidade das células β pancreáticas, alterando o fornecimento de glicose ao feto. Esse mecanismo metabólico pode alterar a insulina e a dinâmica da glicose durante os primeiros meses de vida do potro (Dobbs et al., 2012).

2.3.1. Restrição alimentar gestacional e consequências no potro

Um dos aspectos mais importantes da nutrição durante a gestação é garantir que a égua se mantenha fora do balanço energético negativo, evitando perdas significativas na condição corporal. Se o incremento no ganho de peso durante gestação é inferior a 10%, éguas irão utilizar as reservas corporais para suprir a necessidade do crescimento fetal e placentário

(Kubiak et al., 1988). Embora o catabolismo das reservas corporais não represente um problema para éguas que apresentam uma condição corporal acima de seis durante a gestação, a consequência para éguas que possuem um escore corporal menor podem ser mais graves (Lawrence et al., 1992).

Quando a disponibilidade de glicose útero-placentária é restrita no final da gestação pelo jejum, as concentrações maternas e fetais de lipídios e ácidos graxos livres aumentam em associação com o aumento da produção útero-placentária de prostaglandinas e o início precoce do trabalho de parto (Fowden et al., 1994a). Isso sugere que o metabolismo útero-placentário é responsivo à disponibilidade de substrato e, ao mudar para o metabolismo da gordura quando a disponibilidade de glicose é limitada, os tecidos útero-placentários podem aumentar a produção de ácido araquidônico, o precursor da síntese de prostaglandinas (A. L. Fowden et al., 2000).

O feto equino parece ter uma capacidade limitada de produção endógena de glicose no final da gestação em comparação com outras espécies. Eles têm atividade mais baixa das principais enzimas gliconeogênicas e glicogênio armazenado em seus fígados do que os fetos de outras espécies (Fowden, 1997). Eles não ativam a glicogênese perto do termo ou em resposta ao jejum materno de curto prazo, portanto a utilização de glicose fetal cai drasticamente nos fetos com a desnutrição materna (A.L. Fowden et al., 2000).

Além disso, durante o jejum materno, os fetos usam proporcionalmente mais glicose disponível para o metabolismo oxidativo, o que sugere que eles têm capacidade limitada de mudar para combustíveis alternativos quando a disponibilidade de glicose é reduzida de forma aguda (A.L. Fowden et al., 2000). Há, portanto, um equilíbrio metabólico apertado entre a égua e seu útero gravídico no final da gestação, o que pode ter consequências adversas na gestação se a disponibilidade materna de nutrientes for menor ou as demandas fetais de nutrientes forem maiores que o normal para o estágio da gestação (Fowden et al., 1994b). Isso pode explicar, em parte, a variável duração gestacional das éguas e sua incapacidade de levar gêmeos até o termo (Fowden et al., 2019).

2.3.2. Excesso de peso na gestação

A obesidade também pode ter efeitos deletérios na formação do feto equino, estudos realizados com éguas obesas sugere que estas apresentam concentrações elevadas de insulina, leptina e colesterol total, e tendem a ter triglicerídeos aumentados e sensibilidade à insulina diminuída. Embriões de éguas obesas apresentam transcrição alterada em genes para

inflamação e homeostase lipídica, bem como estresse oxidativo mitocondrial no retículo endoplasmático e impressões lipídicas alteradas. O endométrio de éguas obesas apresentou aumento da expressão de citocinas inflamatórias, regulação da homeostase lipídica, estresse mitocondrial e sistema IGF2, este estudo sugere que essas alterações podem afetar a programação pré-natal, com potenciais efeitos a longo prazo na prole (Sessions-Bresnahan et al., 2018).

A obesidade já é considerada um estado inflamatório crônico (Dandona et al., 2005). O tecido branco adiposo é composto de adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos. Estudos tem demonstrado que estes adipócitos e macrófagos secretam, além das adipocinas, uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 em humanos e roedores (Tilg & Moschen, 2006). Vick et al., 2008, demonstraram que os adipócitos dos equinos também são capazes de produzir citocinas inflamatórias como TNF- α , de modo a aumentar seus níveis circulantes.

Estudo realizados com éguas obesas e seus respectivos potros demonstraram que a obesidade materna, associada à resistência à insulina, alteram a secreção de adipocinas e aumentam a inflamação de baixo grau nessas éguas gestantes. Essas alterações epigenéticas do ambiente materno, como mostra a figura 3, levam a inflamação de baixo grau, resistência à insulina e o desenvolvimento transitório de lesões de osteocondrose em potros até os 18 meses de idade (Robles et al., 2018).

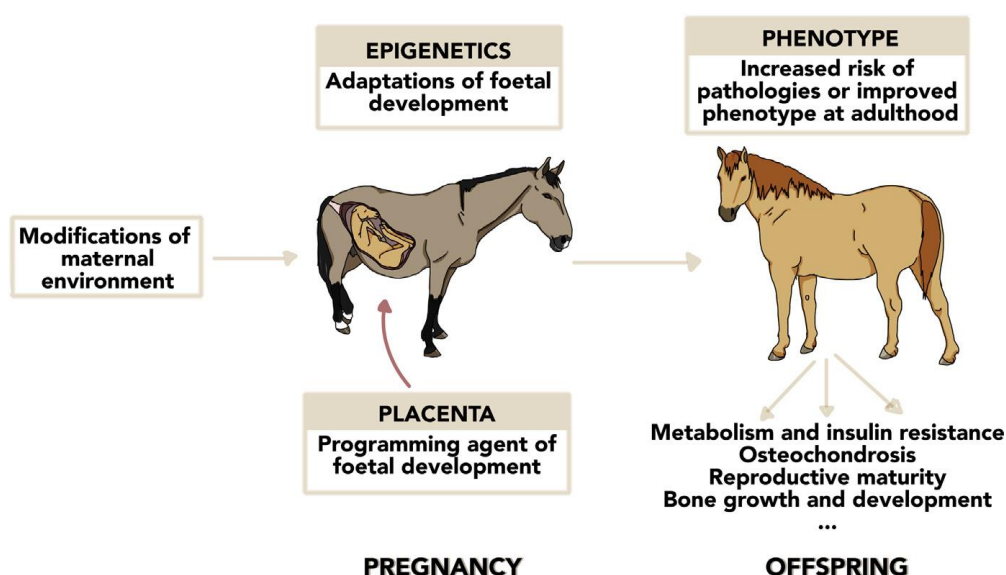


Figura 3- Princípios da saúde e doença nos equinos. Imagem adaptada de Robles et al,

2.4. AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL DE ÉGUAS GESTANTES

A avaliação constante da condição corporal de éguas gestantes é de grande importância em um manejo. O monitoramento nutricional das éguas gestantes pode evitar problemas clínicos e metabólicos tanto na genitora quanto no feto. A relação entre medidas subjetivas, (escore de condição corporal - ECC) e morfométricas (espessura de gordura subcutânea) foram estabelecidas de uma forma prática e auxiliam no monitoramento da diminuição ou incremento da gordura corporal a campo (Henneke et al., 1983; Gentry et al., 2004; Carter et al., 2009; Dugdale et al., 2011).

O ECC das éguas pode afetar diversos componentes da eficiência reprodutiva incluindo taxa de concepção, intervalo de partos, duração da gestação, número de ciclos, duração do ciclo estral e perdas embrionárias (Henneke et al., 1983; Henneke et al., 1984; Hines et al., 1987; Gastal et al., 2004).

Os trabalhos de R.W. Quinn, A.O. Burk, 2006, afirmam que o ideal seria manter a égua antes, durante e após a gestação dentro de um ECC adequado, para prevenir perdas significativas de condição corporal durante o desenvolvimento fetal ou na lactação e evitar distúrbios metabólicos não devendo ser alimentadas até a obesidade.

A fase de desenvolvimento fetal é um momento de grande vulnerabilidade as influências ambientais, incluindo a nutrição materna, que pode levar a distúrbios metabólicos (Nathanielsz, 2006b). Portanto, o monitoramento do padrão corporal de éguas gestantes é uma das formas de prevenir o aparecimento de alterações metabólicas no neonato.

2.4.1. Avaliação subjetiva do escore corporal

A avaliação do ECC é um método prático e simples que não necessita de equipamentos e baseia-se em indicadores de gordura corporal que ajudam a estimar a quantidade de energia armazenada no corpo do animal (Henneke et al., 1983).

Henneke et al., 1983 desenvolveram uma escala de ECC com éguas Quarto de Milha no terço final da gestação, baseada na observação da aparência e na palpação da cobertura de gordura em seis áreas do corpo do animal: bordo dorsal do pescoço, cernelha, costelas, parte posterior das espáduas, processos espinhosos lombares e área de inserção da cauda (Fig. 4).

Esta escala de ECC varia de 1 até 9, sendo o número 1 referente ao animal excessivamente magro e 9 ao animal excessivamente obeso (ver anexo 1). O ECC 5 (moderado)

é considerado o ECC ideal para a obtenção da máxima eficiência reprodutiva das éguas (National Research Council, NRC, 2007). Um equino dentro do ECC 5 encontra-se no início da deposição de gordura do tipo esponjosa na região de inserção da cauda, a cernelha é arredondada sobre os processos espinhosos, os ombros e o pescoço estão ligados suavemente ao corpo do animal e, apesar de não ser possível a observação das costelas, elas são facilmente palpáveis.

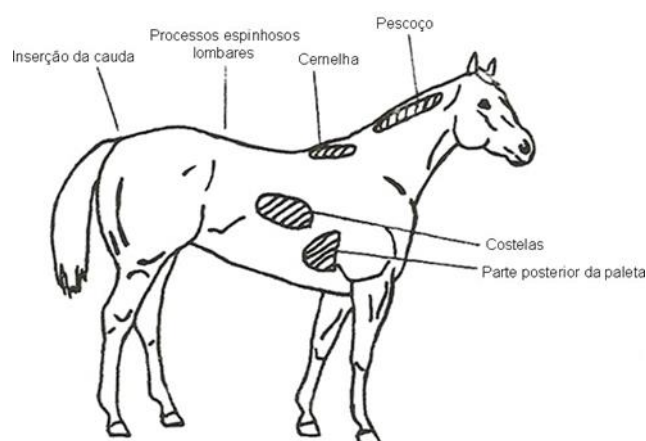


Figura 4- Áreas palpáveis para a estimativa da gordura corporal e do escore de condição corporal. Adaptado de Henneke et al. (1983).

Este método (Henneke et al., 1983), quando devidamente aplicado, não é influenciado pelo tamanho, conformação, perímetro torácico, altura, características da pelagem ou estágio fisiológico dos animais, pois estes autores encontraram correlação positiva entre o ECC e a porcentagem de gordura corporal, confirmando a hipótese de que este sistema considera o animal como um todo e não apenas medidas individuais.

2.4.2. Avaliação ultrassonográfica de deposição de tecido adiposo

Em 1976, R. G. Westervelt, e J. R. Stouffer foi um dos primeiros pesquisadores a realizar um estudo na predição da quantidade de gordura corporal em cavalos e pôneis por meio de ultrassonografia na garupa. Estes autores comprovaram a eficácia deste método devido à alta correlação obtida entre a espessura de gordura subcutânea na garupa e os valores obtidos mediante análise química da carcaça.

A avaliação ultrassonográfica de pontos anatômicos específicos é um método bastante viável, além de ser uma técnica de mensuração extremamente confiável e de baixo custo (R. G. Westervelt, J. R. Stouffer, 1976; Gentry et al., 2004).

El-maaty et al., 2017 utilizando ultrassom Doppler de onda pulsada SonoAce R3 equipado com transdutor linear de 12 MHz mostraram em seu estudo que medidas morfométricas e de gordura no dorso são as avaliações mais fáceis e simples de sobrepeso obesidade.

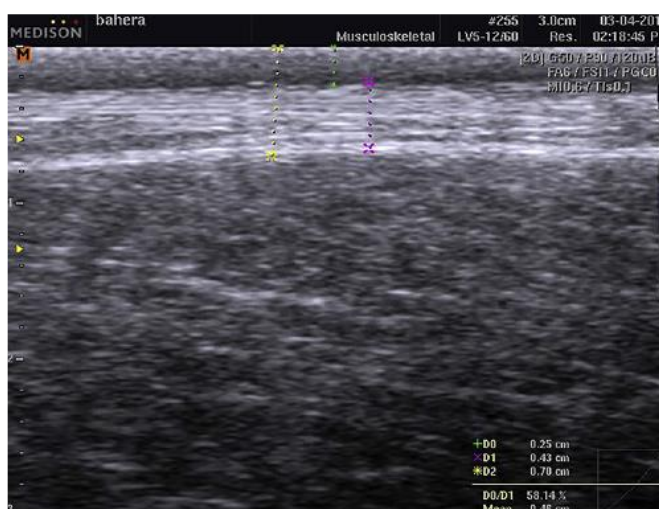


Figura 5- Medida da espessura da gordura de 0,43 cm (linha pontilhada rosa) e pele (linha pontilhada verde) de 0,25 cm. Essa medida de espessura de gordura foi compatível com um ECC moderado. ECC, escore de condição corporal.

2.5. BIOMARCADORES SÉRICOS

Avaliações laboratoriais são de grande importância no monitoramento de enfermidades, e as avaliações séricas tornam-se formas práticas e não invasivas de monitorar o metabolismo e o desenvolvimento de enfermidades indesejáveis que trazem prejuízos aos criatórios.

Em equinos, muitas pesquisas tem sido desenvolvidas na busca de marcadores de perfil energético (Chavatte-Palmer and Robles, 2019; Vick et al., 2007; Ousey et al., 2008; Marchiori et al., 2015), assim como marcadores precoces de inflamação e proteínas de fase aguda (Hultén et al., 1999). Com o estabelecimento dessas pesquisas, as proteínas de fase aguda (PFA) tem sido cada vez mais utilizadas no diagnóstico e prognóstico para várias doenças que acometem os animais domésticos, em especial, os equinos (Eckersall and Bell, 2010a).

Além dos marcadores acima citados também têm sido realizadas pesquisas para identificar moléculas que possam servir como marcadores precoces de problemas metabólicos em tecidos ósseos e na cartilagem, aplicando-os ao estudo do metabolismo ósseo nos cavalos (Lepage, O.M, Carstanjen & Uebelhart, 2001; Allen, 2003; Lepage et al., 1998; Price et al., 1995; Price, 1998).

2.5.1. Biomarcadores de Metabolismo Energético

Em cavalos e pôneis existe correlação positiva entre ECC, espessura de gordura subcutânea, concentração plasmática de leptina, expressão gênica de citocinas inflamatórias e resistência periférica à insulina, assim como correlação negativa com a concentração plasmática de adiponectina (Burns et al., 2010; Amaral et al., 2017; De Araújo et al, 2018). Por outro lado, estudos mostram que a inanição apresenta taxas de leptina e insulina baixas e de adiponectina alta (Pereira De Melo et al., 2011).

2.5.1.1. Leptina

Embora seja sintetizada principalmente pelo tecido adiposo, outros órgãos também podem produzi-la. Em humanos e ratos observa-se secreção de leptina a partir da placenta, estômago e glândula mamária (Ricci & Bevilacqua, 2012).

A leptina é caracterizada como o hormônio da saciedade (Cavinder et al., 2007) e produzida em proporção a quantidade de gordura armazenada sendo dessa forma necessário informar ao sistema nervoso central (SNC) o estado de energia excessiva do corpo de modo a suprimir a ingestão de alimentos e permitir o gasto de energia (Ricci & Bevilacqua, 2012). Como um hormônio da saciedade, as concentrações de leptina podem mudar em resposta a ingestão de calorias e podem suprimir o apetite, aumentar a taxa metabólica, regular o ganho de peso e a deposição de gordura (Campfield et al., 1995). Estudos em humanos demonstram uma correlação positiva entre a síntese e a liberação de leptina e o índice de massa corporal ou percentual de gordura corporal (Smith et al., 2002).

As concentrações de leptina circulantes estão correlacionadas com a condição corporal também em equinos, onde animais que apresentam maior quantidade de gordura armazenada apresentam também maiores níveis de leptina. A influência da gordura corporal sobre a maior concentração de leptina dá apoio para o fato de que a leptina é um indicador do grau de gordura corporal (Cavinder et al., 2007).

Em estudos com roedores, a obesidade tem sido associada com um estado de resistência à leptina, caracterizada por uma falha na detecção do aumento de leptina na circulação (Scarpace & Zhang, 2009). A resistência a leptina tem sido considerada como uma causa potencial de obesidade, principalmente devido à incapacidade da leptina de alcançar os seus locais de destino no cérebro e/ou a redução dos receptores de leptina intracelulares (OB-Rb) na cascata de sinalização (Ricci & Bevilacqua, 2012).

A leptina também desempenha um papel importante na reprodução, ou seja, ela age sobre as células do hipotálamo estimulando a liberação de gonadotrofinas, tendo assim uma influência reprodutiva em potencial (Cavinder et al., 2007). Estudos realizados em ratos descobriram que a leptina pode alterar a frequência de pulsos de LH (Hormônio Luteinizante). Baixos níveis de leptina podem influenciar negativamente a regulação neuroendócrina do sistema reprodutivo, em contrapartida níveis elevados de leptina podem influenciar negativamente a função ovariana normal e / ou desenvolvimento embrionário e a viabilidade fetal (Smith et al., 2002).

A alta produção de leptina pode ser uma tentativa de compensar a diminuição da sensibilidade à leptina podendo dessa forma explicar as grandes variações plasmáticas de leptina entre os pôneis obesos com escore de condição corporal semelhante (van Weyenberg et al., 2013).

Cavalos com diferentes estados nutricionais mostram que depósitos de gordura podem influenciar o estado inflamatório de um animal, demonstrando que esses depósitos são importantes contribuintes para a expressão de adipocinas pró-inflamatórias (Bruynsteen et al., 2013). A leptina, no entanto, amplifica as características do tecido adiposo, dando-lhe a características de um órgão endócrino, e certamente sua função é o principal sinal aferente para o sistema nervoso central no ajuste da adiposidade (Nabi et al., 2014) .

Estudos demonstram que a leptina encontrada na placenta de éguas gestantes pode ter atividade parácrina no crescimento fetal, maturação orgânica e na regulação do sistema imunológico neonatal, como descrito em humanos e equinos (Lord et al., 1998; Pazinato et al., 2019).

Estudos em humanos mostram a leptina como um importante regulador neuroendócrino e no metabolismo ósseo através de vias diretas e indiretas e anormalidades ósseas podem estar relacionadas a sua deficiência.

2.5.1.2. Adiponectina

Pesquisas realizadas em humanos demonstraram que o tecido adiposo visceral (mais do que o tecido adiposo subcutâneo), está envolvido na secreção de adipocitoquinas, mas o mecanismo pelo qual a adiponectina plasmática está diminuída na obesidade ainda não está completamente elucidado. No entanto, foi levantada a hipótese de que o aumento dos níveis de TNF- α ou produtos secretados pelo tecido adiposo visceral em humanos obesos pode ser responsável pela inibição da síntese ou secreção de adiponectina (Ricci & Bevilacqua, 2012). A adiponectina com ação anti-inflamatória é expressa em condições de baixa carga energética (Trayhurn, 2013).

2.5.2. Biomarcadores de Inflamação

A resposta de fase aguda é um mecanismo fisiopatológico de defesa associado à inflamação que, apesar do termo, ocorre tanto nas inflamações agudas quanto nas crônicas. É caracterizada pela variação (aumento ou diminuição) da concentração sérica de determinadas proteínas em decorrência de algum estímulo que cause danos tecidual. Atualmente, opta-se por utilizar o termo biomarcador inflamatório ao se referir às proteínas envolvidas nessa resposta (Rosa Neto & Carvalho, 2009). A resposta de fase aguda pode resultar em variações de mais de 200 proteínas, que podem ser denominadas de proteínas de fase aguda positivas, quando há elevação das concentrações séricas, ou negativas, quando há diminuição (Carolyn Cray et al., 2009).

A obesidade está associada com metainflamação (inflamação subclínica crônica), caracterizada por aumento de citocinas circulantes e infiltração de células do sistema imune inato nos tecidos periféricos sensíveis à insulina, com RI mediada pelas citocinas pró inflamatórias como interleucina-1 β (IL- 1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF α). Esse estado inflamatório se estende à placenta causando implicações negativas na função placentária e desenvolvimento fetal (Segovia et al., 2015). Já em situações de estresse, na desnutrição, ocorre alterações no metabolismo proteico hepático constituindo reações de fase aguda, caracterizadas pela diminuição da síntese hepática de albumina com favorecimento da síntese de proteínas de fase aguda (PCreativa, complemento, inibidores de protease, ceruloplasmina, alfa-macroglobulinas, entre outras) (Pereira, 2007).

2.5.2.1. Proteínas de Fase Aguda Positivas

São consideradas proteínas de fase aguda positivas, aquelas que apresentam elevação da concentração sérica durante a resposta inflamatória. A proteína C reativa, o dímero-D, a proteína ligadora de manose, a alfa-1 antitripsina, a alfa-1 antitripsina, a alfa-2 macroglobulina, o fibrinogênio, a protrombina, o fator VIII, o fator de Von Willebrand, o plasminogênio, os fatores do complemento, a ferritina, a amilóide A sérica, a ceruloplasmina, a haptoglobina e a glicoproteína ácida (Kaneko, 2008; Jain, Gautam & Naseem, 2011). Essas proteínas desempenham diversas funções fisiológicas para o sistema imunológico, como destruição ou inibição do crescimento de micro-organismos, atuação nas situações de inflamação sistêmica associada à anorexia e alterações metabólicas (Jain et al., 2011).

2.5.2.1.1. Ceruloplasmina

É uma PFA positiva que atua como uma enzima cuprosa oxidase com maior expressão e uma ampla capacidade antioxidante plasmática (Healy & Tipton, 2007). Nos achados descritos por Kim et al., 2011 e Girardi et al., 2019b, as maiores concentrações séricas desta proteína foram associadas com obesidade. Arner et al., 2014 demonstrou a super expressão de ceruloplasmina pelas células adiposas durante processo de hiperplasia, que pode contribuir com até 22% do total dessa proteína plasmática, caracterizando-a como um potencial marcador de adiposidade.

2.5.2.1.2. Haptoglobina

A haptoglobina (Hp) é uma glicoproteína positiva que forma um complexo com a hemoglobina, permitindo sua fagocitose. Esse processo ocorre em eventos patológicos ou fisiológicos que levam à hemólise, evitando que essa molécula cause danos tecidual (Levy et al., 2010). É induzida principalmente pela interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa e é produzida principalmente pelos hepatócitos, mas também é expressa pelos adipócitos do tecido adiposo (Lazalde et al., 2014).

Em animais domésticos, sua expressão também foi observada pelo tecido adiposo de cães (Eisele et al., 2005) e de vacas (Saremi et al., 2012). Isso pode ser explicado pelo fato dessa proteína participar ativamente da diferenciação e maturação dos adipócitos no processo de hiperplasia da massa adiposa (Gamucci et al., 2012).

Hp constitui uma importante ligação entre a obesidade e suas comorbidades, mediando alguns dos efeitos inflamatórios associados ao estado de obesidade. Segundo Levy et al., 2010 Hp está ligada à inflamação crônica de baixo grau relacionada à obesidade e se correlaciona positivamente com várias comorbidades, como resistência à insulina, diminuição da adiponectina, esteatose hepática, hipertrofia e inflamação do tecido adiposo.

2.5.3. Biomarcadores de Metabolismo Ósseo

A renovação do tecido ósseo é caracterizada por duas atividades metabólicas opostas, mas complementares: a reabsorção óssea pelas células osteoclásticas e a aposição do osso recém-formado pelos osteoblastos. Em cavalos, a taxa de remodelação óssea pode ser avaliada por histologia, histomorfometria e análise de biópsias ósseas da tuberosidade coxal (Steiger et al., 1999) ou pela mensuração das concentrações séricas, plasmáticas ou urinárias de marcadores bioquímicos (Lepage, Carstanjen & Uebelhart, 2001).

Os colágenos tipo I, II e III são os mais encontrados no organismo. O tipo I está presente na pele, tendão e osso; o tipo II, em cartilagem e humor vítreo; e o tipo III, em pele e músculos. Cada molécula de colágeno é formada pelo entrelaçamento em tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas chamadas cadeias alfas. Na célula, os colágenos são sintetizados como pró-colágenos. Após a secreção dessas moléculas, seus fragmentos terminais são clivados por meio de enzimas extracelulares chamadas collagenases e liberados à circulação sanguínea (Prockop et al., 1979). Com a clivagem, são formadas as moléculas de colágeno que se polimerizam para formar fibrilas colágenas que, por sua vez, se agregam para constituir as fibras colágenas. Diferentes tipos celulares podem sintetizar colágeno, dependendo de cada tecido. O colágeno tipo I é o principal produto de secreção do osteoblasto, célula responsável pela síntese da matriz óssea orgânica. Cerca de 90% da matriz extracelular óssea é constituída por colágeno tipo I, e os 10% restantes por proteínas não colágenas, como a osteocalcina, osteonectina e outras como alguns fatores de crescimento. Durante o metabolismo ósseo, reabsorção e síntese de tecido, são liberados à circulação fragmentos de moléculas de pró-colágenos (durante a síntese) e colágenos (durante a reabsorção) que, atualmente, podem ser dosificados em soro, plasma ou urina, por técnicas de imunoensaio (Vargas, Audí & Carrascosa, 1997).

Os marcadores de formação óssea são categorizados da seguinte forma: produtos da síntese de colágeno: propeptídeos amino-terminais e carboxi-terminais (PINP e PICP). Enzimas osteoblásticas: fosfatase alcalina total (FA) e fosfatase alcalina específica óssea (FAO). Proteína de matriz: osteocalcina (Shetty et al., 2016). Dentre os marcadores de reabsorção

encontramos: produtos da degradação do colágeno: telopeptídeo de colágeno tipo 1 (CTX-1, NTX-1), metaloproteinases de matriz (MMP), piridinium crosslinks (piridinolina [PYD], deoxipiridinolina [DPD]), hidroxiprolina, Proteínas não derivadas do colágeno: sialoproteína óssea. Enzimas osteoclásticas: catepsina K, Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Marcadores de atividade de osteócitos: Ativador do receptor do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL), Osteoprotegerina (OPG), proteína 1 relacionada a Dickkopf (DDK-1) e Esclerostina (Fig 6).

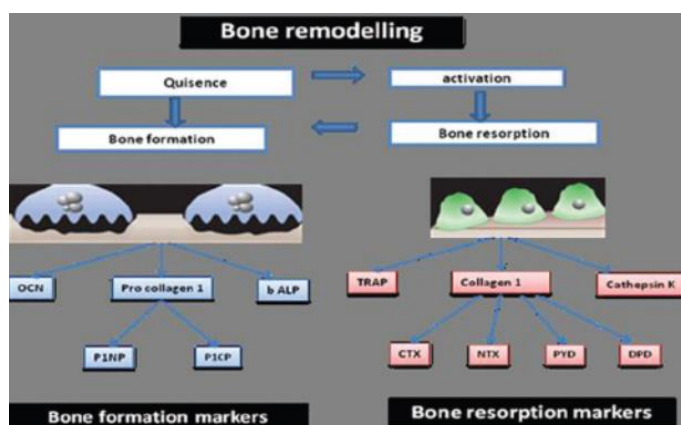


Figura 6- Marcadores de renovação óssea liberados durante a fase de formação e reabsorção na remodelação óssea. (Adaptado de Shetty, et al.: Bone turnover markers)

2.5.3.1. Propeptídeo Aminoterminal de Procolágeno Tipo I (PINP) e Propeptídeo Carboxiterminal de Procolágeno Tipo I (PICP)

Estes peptídeos são as porções terminais da molécula de pró-colágeno, liberado na corrente sanguínea durante a síntese do colágeno tipo I, é secretada no espaço extracelular e então atacada por proteases extracelulares para liberar sequências peptídicas livres (propeptídeos) aminoterminais e carboxiterminais da molécula de procolágeno tipo I (Allen, 2003).

As concentrações séricas dos propeptídeos amino-terminais e carboxi-terminais (PINP e PICP, respectivamente) refletem os níveis de síntese de colágeno tipo I na saúde e na doença, e ambos os marcadores têm sido usados como índices substitutos da formação óssea em doenças ósseas metabólicas (Orford et al., 2014).

2.5.3.2. Osteocalcina

É um peptídeo sintetizado exclusivamente pelos osteoblastos e armazenado na matriz mineral óssea como cristais de hidroxiapatita (Zanatta et al., 2014). A osteocalcina é também chamada de proteína dependente de vitamina K e proteína do ácido gama-carboxiglutâmico óssea (BGP) (Lepage et al., 2001).

A osteocalcina é uma proteína da matriz óssea que tem sido implicada com várias ações hormonais relacionadas à homeostase de glicose e ao metabolismo energético. Modelos animais e experimentais têm demonstrado que a osteocalcina é liberada do osso para a circulação sanguínea e age nas células betapancreáticas e no tecido adiposo. A osteocalcina decarboxilada é a isoforma hormonalmente ativa e estimula a secreção e sensibilidade à insulina no tecido adiposo e muscular. A insulina e a leptina, por sua vez, atuam no tecido ósseo modulando a secreção da osteocalcina, formando uma alça de retroalimentação tradicional em que o esqueleto se torna um órgão endócrino (Zanatta et al., 2014).

2.5.3.3. Telopectídeo Carboxiterminal de Colágeno Tipo I (CTX-I)

Este marcador ósseo é liberado na circulação durante a proteólise do colágeno ósseo pela catepsina K e metaloproteinases, sendo sua concentração sérica um indicador sistêmico de reabsorção óssea (Kamr et al., 2020). A quebra do colágeno tipo I, que é mediada por estas proteases ácidas derivadas de osteoclastos, leva à liberação de metabólitos livres e ligados a peptídeos da molécula de colágeno tipo I (Coleman, 2002). Fragmentos liberados das regiões dos terminais amino e carboxi do colágeno tipo I são chamadas de N-terminal telopeptídeo (NTX) e o telopeptídeo C-terminal (CTX), respectivamente. Esses telopeptídeos consistem em sequências peptídicas curtas do domínio helicoidal de uma molécula do tipo I e da região telopeptídeo de uma molécula adjacente, unidas por uma ligação cruzada de piridínio (Piridinolina e deoxipiridinolina) (Allen, 2003).

2.5.3.4. Cobre

O cobre é um oligoelemento essencial que participa de diversos processos metabólicos fundamentais. Ele integra várias enzimas de importância biológica, atuando na síntese de hemoglobina, na regulação do sistema imunológico, no metabolismo ósseo, no crescimento e no funcionamento do sistema nervoso (Stahl et al., 2024). Este elemento está distribuído em altas concentrações no organismo, com aproximadamente 50% a 70% presente em músculos e

ossos, 20% no fígado e 5% a 10% no sangue (Doguer et al., 2018) . No fígado, o cobre se liga à ceruloplasmina, proteína responsável por seu transporte para os tecidos periféricos (Belli et al., 2021).

De acordo com Xinhua et al. (2018), o cobre é essencial para a manutenção da densidade mineral óssea, sendo necessário para o adequado desenvolvimento esquelético, especialmente por seu papel como cofator em várias enzimas envolvidas na formação e remodelação óssea. Dentre essas enzimas, destaca-se a lisil oxidase, que catalisa as ligações cruzadas entre colágeno e elastina na matriz extracelular, conferindo ao tecido ósseo propriedades biomecânicas como resistência e flexibilidade. A deficiência de cobre pode comprometer a mineralização óssea, levando à diminuição da densidade mineral e ao aumento da fragilidade óssea, o que predispõe a fraturas e a outras alterações degenerativas do esqueleto (Zhang et al., 2024).

Nos neonatos, o papel do cobre é ainda mais crucial, pois ele contribui diretamente para o crescimento ósseo e o desenvolvimento estrutural. Durante esse período, ocorre uma importante transição no metabolismo do cobre, que é redistribuído dos estoques hepáticos acumulados durante a vida fetal para os ossos, onde desempenha funções fundamentais na formação e maturação do tecido ósseo. A insuficiência de cobre nesse estágio pode causar distúrbios ortopédicos, como a osteocondrose, e outras deficiências no desenvolvimento, reforçando sua importância na homeostase e no fortalecimento do sistema esquelético desde os primeiros dias de vida (Stahl et al., 2024). Estudos de Puchkova et al. (2018) mostram que, em recém-nascidos humanos, os mecanismos moleculares que regulam a homeostase do cobre são adaptados à ceruloplasmina presente no leite materno, que atua como uma fonte dietética crucial desse oligoelemento.

2.6. DESENVOLVIMENTO E ALTERAÇÕES ÓSSEAS NO POTRO

O crescimento longitudinal dos ossos resulta de uma série de eventos ocorrendo em regiões altamente especializadas em uma extremidade ou em ambas dos ossos. Estas regiões são chamadas fises, placa de crescimento, ou mais corretamente placa de crescimento metafisária. O processo ocorre na placa de crescimento e a ossificação endocondral é caracterizada pela rápida diferenciação e maturação das células cartilaginosas e sua transformação de cartilagem em osso (Desjardins & Hurtig, 1990).

Segundo Ytrehus et al., 2007, como a osteocondrose, outras doenças como deformidades angulares e flexurais podem aparecer dentro de semanas ou meses de vida. Os

fatores etiológicos podem ocorrer em uma área ainda não investigada intensamente em cavalos, denominada o ambiente de prenhes.

Mensurações de adequado desenvolvimento musculoesquelético incluindo estatura e peso ao nascimento, relações entre as massas musculares, tamanho ósseo e exame de espessura de cartilagem podem ser determinadas por radiografia ou ultrassonografia após o nascimento. A maioria das anormalidades clínicas significativas tem sido associadas à cartilagem epifisária menos espessa que o normal para a idade (Lecocq et al., 2008).

A rotina radiográfica em cavalos jovens de alto desempenho tem sido comumente feita na raça Puro Sangue de Corrida, mas também realizadas em outras raças. Esta prática tem apresentado como resultado, o diagnóstico de frequentes anormalidades, que muitas vezes são clinicamente silenciosas, mas são de interesse para compradores e vendedores de animais desta categoria (Santschi, 2013).

O exame radiológico nos leilões de potros puro sangue é uma prática comum nos Estados Unidos. Embora, seja aceito que a maioria dos animais de um ano apresentam mudanças radiológicas julgadas normais ou não há dados que estimam uma prevalência de alterações nestes animais no momento da venda (Kane et al., 2000).

Segundo Lepeule et al., 2008 a prevalência de desenvolvimento das anormalidades radiológicas ortopédicas com ou sem significância clínica em equinos de seis meses são 25% na raça *Warmblood*, 41% em *Standarbreds* e 34% em Puro Sangue de Corrida. Nestes últimos, animais no começo da vida atlética, apresentaram 86,3% de anormalidades radiológicas, *Standarbreds* 42%, *Warmbloods* 69,5% e *Quarto de Milha* entre 1-2 anos, 89%.

No estudo feito por Kane et. al. (2000), foram vistas modificações radiológicas nos boletos, sesamóides proximais, carpo, tarso, articulação fêmuro-tíbio-patelar e ossos do casco. Muitas destas modificações radiológicas foram achados acidentais. Este estudo mostra dados que podem ser usados por pesquisadores e clínicos a focar nos problemas, nas áreas mais comumente afetadas e identificar potros com modificações radiológicas incomuns que precisam de mais investigações (Kane et al., 2000).

Kane et al. (2000) realizaram a avaliação radiológica de 1162 potros durante os anos de 1993 a 1996, categorizando as alterações de acordo com a localização e o tipo de lesão. Os resultados indicaram que, na articulação metacarpofalângica e nos sesamoides proximais, a alteração mais comum foi observada na região distal dorsal do terceiro metacarpo (incluindo o

terço proximal da crista sagital dorsal), onde 84% dos potros apresentaram uma "notch" semicircular considerada normal no aspecto proximal da crista sagital dorsal. Além disso, 15% apresentaram radioluscência nessa região, enquanto 9% exibiram achatamento da crista sagital distal do terceiro metacarpo. Outras alterações incluíram achatamento do côndilo distal na face palmar do terceiro metacarpo, presente em 40,9% dos potros, com radioluscência associada em apenas 0,4%, e lise supracondilar palmar no terceiro metacarpo em 4,8%. Foram ainda encontradas fraturas nos sesamoides em 1% dos potros, e radioluscência nesses ossos em 14,6% dos casos.

Na articulação metatarsofalangeana e nos sesamoides proximais do membro pélvico, fragmentos na região proximal plantar foram encontrados em 5,9% dos potros, sendo 4,1% deles com fragmentos articulares. Alterações na região distal dorsal do terceiro metatarso, incluindo o terço proximal da crista sagital dorsal, foram observadas em 28,7% (334 animais). Além disso, achatamento distal no aspecto plantar do terceiro metatarsiano foi registrado em 6,4% dos potros, com apenas um caso apresentando radioluscência nessa região. Radioluscências circulares nos sesamoides foram observadas em 15,6% dos casos, sendo mais comum no sesamoide medial (Kane et al., 2000).

No tarso as variações mais encontradas foram fragmentos ou concavidades da crista intermediária da tíbia em 4,4% dos animais, osteófitos ou entesófitos na intertarsiana distal ou na tarsometatarsiana em 17,5% e radioluscências subcondrais em 7,3% dos potros (Kane et al., 2000).

Na articulação femorotibiopatelar 5,8% dos animais de um ano apresentaram modificações na tróclea lateral do fêmur; achatamento em 0,6% e radioluscências ou fragmentos foram vistos em 5,1%. Dois potros tinham área de radioluscências com ou sem fragmentos na tróclea medial. As lesões trocleares tendem a ser unilaterais, mas podem ocorrer bilateralmente. Um dos animais tinha uma área radioluscente na articulação femoropatelar, dois tinham radioluscência na patela, e um tinha fragmento na parte distal da patela. O côndilo medial do fêmur e proximal da tíbia só pode ser visualizado em 170 potros. Não foram vistos cistos subcondrais nestes animais (Kane et al., 2000).

2.6.1. Avaliação Radiológica de Potros

Segundo (Morgan, 2013), as projeções padrões para a articulação metacarpofalangeana são, dorsopalmar elevada 10-15 graus, lateromedial, lateromedial flexionada, dorsomedial (15-20 graus) palmarolateral obliquada e dorsolateral (15-20 graus) palmaromedial obliquada.

Becht and Park, 2000, citam que existem variações normais na articulação metacarpofalangeana entre elas achatamento da crista sagital do terceiro metacarpiano sem lise subcondral e/ou fragmento na projeção lateromedial flexionada, achatamento distal no aspecto palmar da superfície articular do terceiro metacarpiano sem lise subcondral, variação de tamanho e visibilidade da crista transversa na superfície articular distal do terceiro metacarpiano, falsa linha de fratura produzida pela sobreposição da base do sesamóides proximal sobre a eminência proximal no aspecto palmar da primeira falange, todas estas variações vistas na projeção lateromedial flexionada. Na projeção lateromedial vemos ainda variação no local do forâmen vascular através do córtex dorsal da primeira falange, também visto nas obliquadas. Podemos também visualizar nas obliquadas as seguintes variações radiolucências circulares representando a cavidade medular da primeira e segunda falange, sesamóide proximal medial mais cuboide que o lateral, centro de ossificação separado no aspecto proximal dos sesamóides proximais e borda distal achatada dos sesamóides.

Segundo Santschi, 2013^a, as principais projeções de rotina para articulação do tarso são dorsomedial 65 graus plantarolateral obliquada, dorsal- plantar (dorsolateral 10 graus plantaromedial obliquada), dorsolateral 45 graus plantaromedial obliquada e lateromedial.

As variações que aparecem no tarso segundo Becht and Park, 2000 são achatamento do aspecto dorsal da tróclea medial do talus na projeção lateromedial e dorsolateral 45 graus plantaromedial obliquada, visualização do espaço articular talocalcanea na lateromedial, variação na superfície da eminência óssea do aspecto distal da tróclea medial do talus, variação na superfície distal da crista intermediária da tibia na projeção lateromedial e dorsolateral 45 graus plantaromedial obliquada, na dorsoplantar visualizamos variações no aspecto lateral e medial no espaço articular das intertarsianas, na dorsolateral 45 graus plantaromedial obliquada ainda visualizamos a superimposição da tuberosidade medial no aspecto proximal do talus sobre crista intermediária distal da tíbia e uma claridade do canal do tarso.

As projeções para a articulação fêmuro-tíbio-patelar são: latero medial, projeção 20 graus caudoproximal-craniodistal e caudolateral-crâniomedial 20 graus oblíquada (Santschi, 2013).

Na projeção caudolateral-crâniomedial 20 graus oblíquada podemos visualizar radiolucências e esclerose no côndilo medial do fêmur, fragmentos osteocondrais e radiolucências na tróclea lateral do fêmur, radiolucências e esclerose no platô medial e lateral da tíbia (Santschi, 2013).

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os marcadores moleculares em éguas submetidas a diferentes regimes nutricionais e correlacioná-los com os marcadores observados nos potros, com o objetivo de identificar fatores maternos que possam influenciar o metabolismo neonatal e seu desenvolvimento.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter dados relacionados as proteínas de fase aguda soro amiloide A, ceruloplasmina e haptoglobina nas éguas submetidas a diferentes manejos nutricionais pré e pós-parto;

Obter dados relacionados de leptina e adiponectina nas éguas submetidas a diferentes manejos nutricionais no pré e pós-parto;

Estabelecer a relação de condição alimentar, escore corporal nas éguas e seus marcadores pré e pós-parto;

Estabelecer se a condição da matriz pode influenciar no metabolismo do cobre do recém-nascido relacionando ceruloplasmina da égua com níveis de cobre do potro.

Obter dados relacionados a proteínas de fase aguda dos potros até 1 ano de vida;

Mensurar níveis de marcadores inflamatórios em potros recém-nascidos provenientes de éguas dos diferentes grupos;

Obter dados relacionados a marcadores de metabolismo ósseo dos potros (PINP, PICP, CTX-I, osteocalcina e cobre) até 1 ano de vida;

Fazer a correlação entre os marcadores de metabolismo ósseo em potros aos 7 dias, 6 meses e 1 ano de vida;

Avaliação radiológica dos potros no terceiro mês de vida;

Definir se biomarcadores de metabolismo ósseo podem ser uma forma segura para definição de problemas osteoarticulares nos potros relacionando marcadores de formação e reabsorção óssea com avaliações radiológicas.

4. ARTIGO 1

Association between Ceruloplasmin levels in Peripartum Mares and Ceruloplasmin and Copper levels in their respective foals

Highlights

- Ceruloplasmin levels increase during the pre-partum period and decrease significantly post-partum in mares.
- The reduction of ceruloplasmin in mares is correlated with elevated copper levels in foals.
- The nutritional management of mares influences ceruloplasmin levels and copper metabolism in foals.

Original Research Papers (Regular Papers)

Association between Ceruloplasmin levels in Peripartum Mares and Ceruloplasmin and Copper levels in their respective foals

Gonçalves LM ^a, Pradella GD ^b, Brum DS ^c, Tusi MM ^d, Resmin CM ^e, Azevedo MS ^f, Corrêa AM ^g, Brunetto G ^h, Leivas FG ⁱ

Department of Veterinary Medicine, Federal University of Pampa, P.O. Box 118. BR 472, km 598, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil, 97500-970

Department of Veterinary Medicine, Federal University of Pampa, P.O. Box 118. BR 472, km 598, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil, 97500-970

Department of Veterinary Medicine, Federal University of Pampa, P.O. Box 118. BR 472, km 598, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil, 97500-970

Department of Biological Sciences, Federal University of Santa Maria., Av. Roraima, 1000 – Bairro Camobi, Santa Maria Rio Grande do Sul, Brazil, 97105-900

Department of Health Sciences, Regional University of the Missions and Alto Uruguay - URI, Santiago Campus, Av. Batista Bonoto Sobrinho, 733 - São Vicente, Santiago, Rio Grande do Sul, Brazil, 97700-000

Department of Veterinary Medicine, Federal University of Pampa, P.O. Box 118. BR 472, km 598, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil, 97500-970

Soil Science Department, Federal University of Santa Maria., Av. Roraima, 1000 – Bairro Camobi, Santa Maria Rio Grande do Sul, Brazil, 97105-900

Soil Science Department, Federal University of Santa Maria., Av. Roraima, 1000 – Bairro Camobi, Santa Maria Rio Grande do Sul, Brazil, 97105-900

Department of Veterinary Medicine, Federal University of Pampa, P.O. Box 118. BR 472, km 598, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil, 97500-970

* Gonçalves LM

E-mail address: lessanamgvvet@gmail.com

ABSTRACT

Molecular changes in pregnancy third trimester may lead to maternal, fetal and neonatal issues. Several substances interfere with pregnancy maintenance and full term, such as protein ceruloplasmin (Cp), which shows abnormal levels in inflammatory processes. Studies with different animal species showed ceruloplasmin's essential role in pregnancy and in milk quality, because of it is newborns' copper source. The aims of the current study are to measure Cp activity in Crioulo mares, in pre- and postpartum periods, under different nutritional regimes, and to assess Cp and copper levels in foals. The investigated mares were split into two groups: group 1 - fed on silage and feed, group 2 - only fed on native pasture. Blood samples of both mares were collected 30 days before parturition, and those of foals 7 days, after it for marker analysis. Statistical analysis was based on two-way ANOVA and Pearson's correlation, at significance level $p < 0.05$. Results showed high Cp levels before parturition and significantly decreased levels of it after parturition. Yet, Cp levels were correlated to mares' nutritional management. Animals recording the highest body-condition scores presented the highest Cp levels. Post-partum Cp level decrease was associated with higher copper concentrations in foals; thus, the higher the post-partum Cp level decrease in mares, the higher the copper content in foals. Cp protein plays essential role in pregnancy, in the peripartum period and in copper concentration in newborns. Its serum levels can be influenced by maternal diet.

Keywords: nutrition; serum markers; pregnancy; foals; reproduction.

5. INTRODUCTION

Equine fetuses present linear growth during the second half of pregnancy and gain 75% of their birth weight from mid- to late gestation [1]. Fetal nutrient requirements for tissue accretion and oxidative metabolism processes increase fast during this period, as fetal mass also increases. This process significantly drains maternal nutritional resources and is followed by increasing maternal insulin resistance, as gestation progresses. This factor, in its turn, increases maternal glucose availability for fetoplacental use purposes, besides being associated with ontogenetic changes taking place in fetal and uteroplacental metabolic rates up to birth [2]. Fetal growth and developmental changes induced by alterations in placental development and maternal food intake can have impact on foals, long after birth [3].

Epidemiological studies conducted with humans and animals have evidenced that suboptimal environments during intrauterine life and at early neonatal life can change individuals' development and make them prone to have lifelong health issues. The concept of adult-onset disease has become well accepted due to animal studies that have accurately defined the outcomes of specific exposure types, such as nutrient restriction, overfeeding during gestation, maternal stress and exogenous glucocorticoids [4]. Therefore, monitoring pregnant mares' body pattern is one way to help preventing the onset of metabolic changes in neonates.

Several endogenous substances play key role in pregnancy, since their serum levels can affect newborns' quality. Equine ceruloplasmin (Cp) is a glycoprotein whose molecular weight reaches approximately 115 kd [5]. It is an acute phase protein whose level increases several times during inflammation, ovulation, pregnancy and lactation processes [6]. According to Burrows & Pekala [7] and Ulutas et al. [8], serum ceruloplasmin levels increase during healthy pregnancy in some species and, assumingly, such increase has protective effect against oxidative stress associated with this period [9]. Moreover, assumingly, Cp is the strongest neutrophils' oxidative burst and apoptosis regulator [6, 10]. According to Jacobsen & Andersen [11], its serum concentration in equine species ranges from 300 to 400 mg/L at normal plasma concentrations, whereas it can range from 700 to 900 mg/L under inflammatory conditions.

Maternal milk Cp is the main extracellular protein copper source for newborns. Copper is found in non-dialyzable fraction in milk and approximately 75–80% of it is found in Cp [12].

Since birth, foals are susceptible to several diseases that are often followed by nonspecific signs, such as decreased milk intake and growth issues [13]. Neonatal diseases can

have multiple causes, but in addition to inadequate immunoglobulin supply, the inadequate supply of trace elements can lead to different diseases and to serious consequences [14]. Copper is an essential trace element involved in several metabolic processes, since it is component to several important enzymes, besides playing key role in hemoglobin synthesis, as well as in individuals' immune system, bone metabolism and growth process [15].

In light of the foregoing, the aims of the current study were to measure ceruloplasmin (Cp) activity in both pre- and postpartum Crioulo mares belonging to two groups subjected to different nutritional management strategies, as well as to assess maternal Cp association with ceruloplasmin and serum copper levels in their respective foals.

6. METHODS

Parturient Animals

In total, 12 (twelve) pregnant Crioulo mares were used in the current study. Six (6) of them (group 1) were fed corn silage and feed in the third trimester of pregnancy (their body condition score – BCS – ranged from 6 to 7). Group 2, in its turn, comprised 6 mares with BCS ranging from 4 to 6; they were only fed native pasture and faced dietary restriction in the third trimester of pregnancy due to weather conditions in the investigated region. Mares' body condition score was assessed based on the method by Henneke et al. [16].

Mares in group 1 were in the age group 4-12 years and presented mean weight of 500 kg (480-520 kg). They were bred in Santa Maria region (geographic coordinates - 29.734365254652932, -53.7709891981308) and gave birth between October and December 2022. They were kept in extensive native pasture system comprising the following forages: *Axonopus affinis*, *Eragrostis plana*, *Desmodium barbatum* and *Aristida* spp [17]. This group was supplemented with corn silage in the third trimester of pregnancy; it was fed diet added with 12% crude protein and had access to water ad libitum [18].

On the other hand, mares in group 2 were in the age group 5-10 years and presented mean weight of 395 kg (360-430 kg). They were bred in Uruguaiana region (geographic coordinates -29.984116187400605, -57.01149389135508) and gave birth between August and October 2022. They were kept in extensive native pasture system, whose native flora comprised 21 species with forage potential. Family Poaceae comprised the largest number of identified species; it was followed by families Fabaceae and Amaranthaceae [19]. Mares in this group had

access to water ad libitum; however, they presented high body score loss and, consequently, weight loss in the third trimester of pregnancy due to drought in the investigated region. Therefore, they were classified as dietary-restriction mares due to this weather variation.

6.1. NEWBORN ANIMALS

Foals of mares belonging to the 2 investigated groups were born in the 2021-2022 season, between August 2021 and September 2022. All foals were born through intervention-free eutocic birth.

6.2. BLOOD SAMPLES COLLECTION AND PROCESSING

Blood samples were collected by puncturing the jugular vein in both mares and foals; they were placed in EDTA-free tubes. Collections were carried out in mares 30 days before parturition, as well as in both mares and foals 7 days after it. Samples were collected in the morning, stored in Styrofoam box filled with recyclable ice and sent to the laboratory within 4 hours after collection. They were centrifuged at 2,200 rpm for 20 minutes, at 24 °C and the serum was stored in microtubes. After this procedure was over, they were stored in freezer at -80°C until serum biomarker measurement time [20].

6.3. CERULOPLASMIN LEVEL DETERMINATION

Ceruloplasmin levels were measured through ELISA test carried out in ELISA Microplate Reader - Multiskan FC Photometer (Thermo Fisher Scientific). The MyBioSource® ELISA kit used to detect Ceruloplasmin in horses presents 96 wells and assay calibration with six curve points, as well as detection ranging from 31.2 – 1,000 µg/mL and analytical sensitivity of 5.0 µg/mL. Analyses were performed in compliance with the manufacturer's instructions. Sample dilution was carried by using 1 aliquot of serum for 5 aliquots of the aforementioned kit's diluents (final dilution of 1/6); it was done by respecting the kit's sensitivity and reference values set for horses [5].

6.4. COPPER CONTENT DETERMINATION

Copper content was measured through flame atomic absorption spectrometry (F AAS) at 1:3 nitric acid: perchloric acid dilution ratio for sample digestion, based on using Santarém's

[21] technique as reference. In total, 1.0 mL equine serum was used in the digestion process. The solution was taken to the digestion block for a pre-determined time; acid extracts deriving from sample mineralization were transferred to a graduated test tube and they had their final volume adjusted based on using distilled water enough to reach 5.0 mL. Copper concentrations were expressed in mg/L and reference values were used based on the literature [21, 22].

7. STATISTICAL ANALYSIS

All data were standardized through Z-score for statistical analysis purposes, based on equation 1:

$$x'_i = \frac{(x_i - \bar{x})}{\sigma} \quad (1)$$

Wherein, x_i and x'_i are the value and the standardized value of the i^{th} datum, respectively; and $\bar{x}$ and σ are the mean and standard deviation of data set for each attribute, respectively.

Statistical analyses were performed in GraphPad Prism 9.5TM software. Variance normality and homogeneity were inferred through Kolmogorov-Smirnov and Bartlett tests. Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Two-way repeated-measure ANOVA was used to assess Cp effects and time x group interactions. Significance level was set at $p \leq 0.05$ and effect sizes were expressed as partial eta-squared (η^2) for ANOVA data.

Pearson's correlation coefficients were calculated based on the PROC CORR procedure in SAS Studio. It was done to establish correlations of different nutritional managements to ceruloplasmin levels at the 30th prepartum and 7th postpartum days, as well as to copper and ceruloplasmin levels in 7-day-old foals.

8. RESULTS

Table 1 shows ceruloplasmin levels observed for mares 30 days before and 7 days after parturition, as well as feeding management type (group), weight, body score, ceruloplasmin level decrease (%) after parturition, and ceruloplasmin and copper levels in 7-day-old foals.

Table 1 - Ceruloplasmin values recorded for mares (before and after parturition), feeding management type, body score, and ceruloplasmin level decrease (%) after parturition, as well as ceruloplasmin and copper levels in foals.

Mare code	Group	Body score	Weight (kilograms) 30 days after parturition	Cp content 30 days before parturition (mg/L)	Cp content 7 days after parturition (mg/L)	Cp content decrease (%)	Cp content in foals (mg/L)	Cu content in foals (mg/L)
1069	1	6.5	510	762.50	164.28	78.45	543.75	0.138
441	1	6.5	520	608.93	122.32	79.91	528.57	0.274
739	1	6.5	480	689.28	186.61	72.93	573.21	0.346
197	1	6	520	583.93	146.43	74.92	532.14	0.566
1093	1	6.5	480	607.14	269.64	55.59	553.57	0.316
77	1	6.5	500	644.64	250.45	61.15	600.00	0.378
Standard Error of the Mean (SEM)		6.41 ± 0.08	501.67 ± 7.49	649.40 ± 27.15	189.96 ± 23.91	70.49 ± 4.03	555.21 ± 11.11	0.34 ± 0.057
810	2	5	420	555.36	308.93	44.37	593.75	0.35
779	2	6	420	591.07	386.16	34.67	591.07	0.178
1394	2	6	400	513.39	159.82	68.87	636.61	0.394
1147	2	6	420	557.14	211.61	62.02	685.71	0.402
1326	2	4	390	555.36	172.32	68.97	644.64	0.446
1319	2	3	400	559.82	282.14	49.60	591.07	0.582
Standard Error of the Mean (SEM)		5 ± 0.51	408.33 ± 5.43	555.36 ± 10.1	253.5 ± 35.88	54.75 ± 5.75	623.8 ± 15.79	0.39 ± 0.053

Based on Table 1, animals in group 1, who were fed feed and silage, recorded mean prepartum ceruloplasmin levels higher than those fed native pasture, whereas mares fed native pasture recorded post-partum Cp levels higher than those fed feed and silage.

Significant decrease in ceruloplasmin levels can also be seen if one compares values recorded 30 days before parturition to those recorded 7 days after it. This decrease ranged from 34.67% to 77.37% in group 2, as well as from 55.59% to 79.91% in group 1.

Mean copper and ceruloplasmin values observed for 7-day-old foals born from mares kept in native pasture was higher - although not significantly - than those observed for foals born from mares subjected to overfeeding in the third trimester of pregnancy.

Two-way repeated measures ANOVA suggested time x group interaction ($F_{1,10} = 11.34$ $p = 0.0072$ $\eta^2 0.5313$) and time effect ($F_{1,10} = 264.6$ $p < 0.0001$ $\eta^2 0.9635$); however, there was no significantly relevant group effect. Šídák multiple comparisons test has shown that both experimental groups recorded significant decrease in Cp levels after parturition (Fig. 1). Moreover, animals in group 1 presented Cp concentrations higher than those observed for animals in group 2, before parturition. However, no significant differences in Cp levels were observed for animals in groups 1 and 2, after parturition.

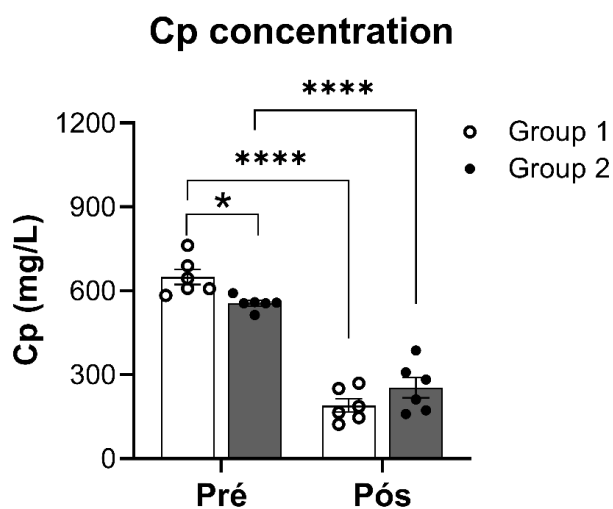


Figure 1 - Ceruloplasmin concentrations in mares belonging to groups 1 and 2.

Table 2 - Shows Pearson's correlation coefficients between pre- and postpartum ceruloplasmin levels observed for mares, feeding management type, body score, postpartum ceruloplasmin level reduction rates, as well as ceruloplasmin and copper levels in 7-day-old foals. Statistically significant correlations are highlighted (in gray) in this table.

	Management	Score	Prepartum Cp	Postpartum Cp	Cp decrease	Cp in foals	Cu in foals
Management	1.00000						
Score	0.73131 0.0069	1.00000					
Prepartum Cp	0.71635 0.0088	0.55022 0.0638	1.00000				
Postpartum Cp	-0.42244 0.1713	- 0.28514 0.3690	- 0.17404 0.5885	1.00000			
Cp decrease	0.57837 0.0488	0.41250 0.1827	0.38454 0.2171	-0.97416 <0.0001	1.00000		
Cp in foals	-0.74700 0.0052	- 0.36504 0.2433	- 0.53166 0.0752	0.15118 0.6391	-0.26264 0.4095	1.00000	
Cu in foals	-0.21880 0.4945	- 0.55023 0.0638	- 0.56349 0.0564	-0.16964 0.5981	0.03773 0.9073	0.22803 0.4760	1.00000

Table 2

Pearson's correlation coefficients.

Based on Table 2, body score has shown positive correlation to feeding management. In other words, overfed animals recorded higher body score, as expected. Likewise, prepartum

ceruloplasmin levels have shown positive correlation to feeding management, and it suggested that overfed animals presented higher ceruloplasmin levels 30 days before parturition. In addition, ceruloplasmin decrease rates have shown strongly negative correlation to ceruloplasmin content 7 days after parturition, i.e., the higher the ceruloplasmin decrease rate, the lower the postpartum ceruloplasmin content. Finally, the last statistically significant correlation was observed between ceruloplasmin decrease in mares and copper concentration in the foals; the higher the ceruloplasmin decrease rate in mares, the higher the copper rate in newborn foals.

9. DISCUSSION

Ceruloplasmin is a positive acute-phase protein (APP) that acts as cuprous oxidase enzyme, besides presenting high hepatic expression and broad plasma antioxidant capacity [23, 24]. Assumingly, proinflammatory cytokines produced in adipose tissues can increase the hepatic synthesis of inflammation-sensitive plasma proteins (ISPPs) that, in their turn, are important risk factors for cardiovascular diseases [25]. Serum Cp concentration in prepartum mares ranged from 513.39 to 762.50 mg/L. These values were above the physiological standards suggested for equine species by Jacobsen & Andersen [11] and Okumura et al. [5], who reported normal plasma Cp concentrations ranging from 300 to 400 mg/L, as well as from 700 to 900 mg/L, for inflammatory conditions. Thus, values recorded for prepartum mares were on the threshold of and within inflammatory conditions.

The higher Cp levels found in group 1 mares can be explained by Arner et al. [26], according to whom, adipose cells overexpress ceruloplasmin during the hyperplasia process and it can contribute to up 22% of the total content of this protein in the plasma, a fact that features it as potential adiposity marker. Moreover, Girardi et al. [27] and Kim et al. [28] reported increase in serum concentrations of this protein associated with weight gain, and it corroborates the current findings.

The current study has also shown that Cp levels in mares have significantly increased before parturition. Similarly, Burrows & Pekala [7] and Ulutas et al. [8] observed increase in serum Cp levels in some species during healthy pregnancies. Assumingly, such increase has protective effect against oxidative stress associated with the gestational period [9], a fact that also explains the herein observed ceruloplasmin levels above the reference values set for the investigated species.

Studies have evidenced that estrogen increases Cp synthesis, as well as the synthesis of many other hepatic proteins. In addition, it can increase serum ceruloplasmin concentration by up to 3 to 4 times during its elevation stage in the estrous cycle [29]. Estrogen levels in mares increase during pregnancy, and it may also explain the high circulating Cp concentrations observed during this period [30].

The sharp decrease in ceruloplasmin levels in mares after parturition ranged from 34.67% to 79.91%. This finding differs from those observed by Okumura et al. [5] and Burrows & Pekala [7], who reported no difference in peripartum ceruloplasmin levels in mares. Studies conducted with humans have shown the important role played by ceruloplasmin in copper assimilation and transfer to the mammary gland - the copper transfer dynamics in milk perfectly matches the ceruloplasmin secretion dynamics [31, 32]. This factor explains the sharp decrease in circulating maternal ceruloplasmin, as well as the need for high ceruloplasmin supply to the mammary gland, since this protein plays key role in transporting copper, which, in its turn, plays essential role in the newborns' structural development process.

Another important aspect observed in the current study lies on the fact that animals fed silage and feed recorded higher ceruloplasmin content decrease after parturition than those fed native pasture. The explanation for this finding may be associated with the key role played by ceruloplasmin during pregnancy, with emphasis on its protective effect against oxidative stress and on its ability to regulate the immune system [23, 24, 33], since this protein is overexpressed by adipose cells during the hyperplasia process [26].

Ceruloplasmin measurements applied to foals 7 days after parturition have evidenced that foals born from group 2 mares recorded higher mean Cp contents than those born from mares subjected to overfeeding in the third trimester of pregnancy. These data differ from those reported by Okumura [34], who observed lower Cp values in samples collected from foals 1 week after birth and on a monthly basis from the age of 7 to 17 months. The aforementioned authors claimed that variations in them can happen among different life stages. According to the aforementioned author, Cp activity is lower in neonates (approximate values of 287.0 ± 4.0 mg/L). It is worth emphasizing that Cp concentrations depend, to certain extent, on the adopted assay; therefore, they can slightly differ between studies [11].

Copper concentrations in newborns reached 0.358 ± 0.12 mg/L. This finding was in compliance with those observed by Stahl et al. [22], who reported copper concentrations of 0.25 ± 0.22 mg/L in 7-day-old foals. The correlation between reduced ceruloplasmin levels in mares

and increased copper levels in foals reflects the relevant role played by copper in neonates' bone metabolism and general health. According to Qu et al. [35], copper plays essential role in bone mineral density, and adequate levels of it are essential for individuals' development, with emphasis on the important role played by balance between ceruloplasmin contents in mares and copper contents in foals.

According to Puchkova et al. [6], molecular genetic mechanisms accounting for copper homeostasis in human newborns, as well as for the ontogenetic copper-metabolism transition from embryonic to adult phase, are highly adapted to milk ceruloplasmin, which, in its turn, acts as essential dietary copper source. These factors may explain the low circulating ceruloplasmin concentrations observed in mares, right after parturition, as way to meet foals' high copper demands during suckling. The study by Puchkova et al. [32], according to whom the mRNA encoding the ceruloplasmin secretory process is found in the transcriptome of mammary gland cells in lactating females, has corroborated this finding. Furthermore, the milk ceruloplasmin mRNA length and molecular mass do not differ from those of hepatic and plasma ceruloplasmin mRNA. According to Platonova et al. [12], milk ceruloplasmin is an important copper source for newborns, since approximately 75%-80% of copper in milk is associated with ceruloplasmin, in a non-dialyzable fraction.

Studies have shown that deficiency in essential trace elements, such as copper, can lead to musculoskeletal changes capable of impairing animal performance [36]. These changes are known as developmental orthopedic diseases (DOD), with emphasis on osteochondrosis, which is one of the main DOD manifestations [37]. According to Hurtig et al. [14], copper deficiency may be one of the factors for osteochondrosis onset, since it induces reduction in bone collagen binding. According to the aforementioned study, ceruloplasmin plays key role in transporting copper to different body parts and is the major copper-binding plasma protein synthesized in the liver. In addition, Cp levels can compromise different systems, such as the bone system, which is a key factor for horses bred for athletic purposes.

10. CONCLUSION

Ceruloplasmin plays key role in copper metabolism in mares, both during pregnancy and after parturition, since it is essential to meet foals' nutritional needs during suckling. Increase in prepartum ceruloplasmin levels was followed by sharp postpartum decrease in them, a fact that reflected Cp transfer to milk. This dynamic play essential role in supplying copper

to foals, as well as in influencing their development. In addition, mare feeding at late pregnancy stage can affect ceruloplasmin levels and copper metabolism in foals, and it can affect their orthopedic health and future performance.

11. DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. Funding sponsors played no role in the study design, data collection, analysis and interpretation processes during manuscript writing or in the decision to publish its results.

12. ACKNOWLEDGEMENT

This work was financed with resources from Laboratório BIOTECH/UNIPAMPA, PROPPI/UNIPAMPA (Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Pampa), and was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil - Finance code 001. The authors thank the Laboratório GEPACES, DBR Biotech, Brazil, for providing data and information.

13. AUTHOR CONTRIBUTIONS

Autor 1 – Conceptualization, Data curation, Validation, Formal analysis, Methodology, Resources, Software, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing,

Autor 2 – Formal analysis, Data curation, Validation

Autor 3 – Funding acquisition, Project administration

Autor 4 – Formal analysis, Data curation, Resources, Software, Visualization

Autor 5 – Formal analysis, Data curation, Software, Visualization

Autor 6 – Project administration, Formal analysis, Supervision, Investigation, Validation,

Writing – review and editing, Visualization

Autor 7 – Formal analysis, Data curation, Validation

Autor 8 – Formal analysis, Data curation, Validation, Visualization

Autor 9 – Supervision, Project administration, Supervision, Investigation, Writing – review and editing, Validation, Visualization

14. BIOETHICS AND BIOSECURITY COMMITTEE APPROVAL

For all due purposes, the authors of the article " *Association between Ceruloplasmin levels in Peripartum Mares and Ceruloplasmin and Copper levels in their respective foals*" declare that the project was approved by UNIPAMPA's Ethics Committee on Animal Use (CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais) under protocol n. 034/2021.

15. REFERENCES

- [1] Platt H. Growth of the equine foetus. *Equine Vet J* 1984;16: 247–52. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1984.tb01920.x>
- [2] Fowden AL, Forehead AJ, White KL, Taylor PM. Equine uteroplacental metabolism at mid- and late gestation. *Exp Physiol* 2000;85: 539–45.
- [3] Fowden AL, Giussani DA, Forhead A. (2019). Physiological development of the equine fetus during late gestation. *Equine Vet J* 2019; 52:165–73. <https://doi.org/10.1111/evj.13206>
- [4] Nathanielsz PW. Animal Models That Elucidate Basic Principles of the Developmental Origins of Adult Diseases. *ILAR J* 2006; 47:73–82. <https://doi.org/10.1093/ilar.47.1.73>
- [5] Okumura M, Fujinaga T, Yamashita K, Tsunoda N, Mizuno S. Isolation, characterization, and quantitative analysis of ceruloplasmin from horses. *Am J Vet Res* 1991; 52:1979–85.
- [6] Puchkova LV, Babiche PS, Zatulovskaia YA, Ilyechova EY, Sole FD. Copper metabolism of newborns is adapted to milk ceruloplasmin as a nutritive source of copper: Overview of the current data. *Nutrients* 2018; 10:1591. <https://doi.org/10.3390/nu10111591>
- [7] Burrows S, Pekala B. Serum copper and ceruloplasmin in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 109:907–9. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(71\)90805-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(71)90805-2)

- [8] Ulutas PA, Musal B, Kiral F, Bildik A. Acute phase protein levels in pregnancy and oestrus cycle in bitches. *Res Vet Sci* 2009; 86:373–6. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.09.001>
- [9] Denko CW. Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents Actions* 1979; 9:333–6. <https://doi.org/10.1007/bf01970657>
- [10] Galenian E, Viryasova G, Galkina S, Gaponova T, Sud'ina G, Sokolov A. Fine Regulation of Neutrophil Oxidative Status and Apoptosis by Ceruloplasmin and Its Derivatives. *Cells* 2018; 7:8.
- [11] Jacobsen S, Andersen PH. The acute phase protein serum amyloid a (SAA) as a marker of inflammation in horses. *EVE* 2007; 19:38–46.
- [12] Plato nova N, Guolikhandanova N, Tsymbalenko N, Zhiguleva E, Zhivulko T, Vasin A, Evsukova I, Puchkova L. Milk ceruloplasmin is a valuable source of nutrient copper ions for mammalian newborns. *J Trace Elem Med Biol* 2007; 21:184–93.
- [13] Smith BP, Van Metre VD, Pusteria N. *Large Animal Internal Medicine*. Elsevier; 2020.
- [14] Hurtig M, Green SL, Dobson H, Mikuni-Takagaki Y, Choi J. Correlative study of defective cartilage and bone growth in foals fed a low-copper diet. *Equine Vet J* 2010; 25:66–73.
- [15] Engelking LR. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*. Elsevier; 2015.
- [16] Henneke DR, Potter GD, Kreider J L. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, 1984;21:897–909.
- [17] Quadros FL, Bica G, Rogério P, Damé V, Dorow R, Kersting C, Pötter L. Levantamento das pastagens naturais da região de Santa Maria/RS, Brasil. *Cienc Rural* 2003;33:921–27.
- [18] Tomich TR, Tomich RGP, Gonçalves LC, Borges I, Rodrigues JAS. (2006). Valor nutricional de híbridos de sorgo com capim-sudão em comparação ao de outros volumosos utilizados no período de baixa disponibilidade das pastagens. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006; 58:1249–52.
- [19] Oliveira DB, Brixner GF, Disconzi MS. Levantamento da Flora do Bioma Pampa com Potencial Forrageiro no Distrito de Ijiquiquá do Município de Uruguaiana/RS. PUCRS; 2009.
- [20] Thrall MA. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. Roca; 2007.

- [21] Santarém C. (2004). Valores séricos de macro e microminerais de eqüinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI), do nascimento aos seis meses de idade. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária. UNESP; 2004.
- [22] Stahl LT, Müller A, Krohn J, Büttner K, Wehrend A. Article Serum concentrations of selenium, copper, and zinc in neonatal foals: Influence of failure of passive transfer and age-related changes. *CVJ*; 2024; 65:481–7.
- [23] Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:439–58.
- [24] Healy J, Tipton K. (2007). Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm* 2007; 114:777–81.
- [25] Engström G, Hedblad B, Stavenow L, Lind P, Janzon L, Lindgärde F. Inflammation-Sensitive Plasma Proteins Are Associated With Future Weight Gain. *Diabetes* 2003; 52:2097–101.
- [26] Arner E, Forrest ARR, Ehrlund A, Mejhert N, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Laurencikienė J, Rydén M, Arner P. Ceruloplasmin is a novel adipokine which is overexpressed in adipose tissue of obese subjects and in obesity-associated cancer cells. *PLoS ONE* 2014;9(3): e80274.
- [27] Girardi FM, Fonseca LA, Ribeiro Filho JD, Souto PC, Ferreira DAC, Dornelas LRSM, Bento LD, Carvalho Filho WP. Influence of Obesity on Serum Concentrations of Acute-Phase Proteins in Horses. *J Equine Vet Sci* 2019;83: 102810.
- [28] Kim OY, Shin MJ, Moon J, Chung JH. Plasma ceruloplasmin as a biomarker for obesity: A proteomic approach. *Clin Biochem* 2011; 44:351–56.
- [29] Ganaraja B, Pavithran P, Ghosh S. Effect of estrogen on plasma ceruloplasmin level in rats exposed to acute stress. *Indian J Med Sc* 2004; 58:150–4.
- [30] Legacki EL, Scholtz EL, Ball BA, Esteller-Vico A, Stanley SD, Conley AJ. (2019). Concentrations of sulphated estrone, estradiol and dehydroepiandrosterone measured by mass spectrometry in pregnant mares. *Equine Vet J* 2019; 51:802–8.
- [31] Donley SA, Ilagan BJ, Rim H, Linder MC. Copper transport to mammary gland and milk during lactation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283: e667–75.

- [32] Puchkova LV, Aleĭnikova TD, Tsymbalenko NV, Zakharova ET, Konopistseva LA, Chebotar' NA, Gaĭtskhoki VS. Biosynthesis and secretion of ceruloplasmin by rat mammary cells during lactation. *Biokhimiia*; 1994;59:296–303.
- [33] Raju KS, Alessandri G, Ziche M, Gullino PM. Ceruloplasmin. *Copper Ions*; 1982.
- [34] Okumura M. Information A Study On Equine Plasma Ceruloplasmin. *JJVR* 1990; 38:76–76.
- [35] Qu X, He Z, Qiao H, Zhai Z, Mao Z, Yu Z, Dai K. Serum copper levels are associatequed with bone mineral density and total fracture. *JOT* 2018; 14:34–44.
- [36] Davis GK. Microelement interactions of zinc, copper, and iron in mammalian species. *Ann New York Acad Sci* 1980; 355:130–9.
- [37] Bridges CH, Harris ED. Experimentally induced cartilaginous fractures (osteochondritis dissecans) in foals fed low-copper diets. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193:215–21.

16. ARTIGO 2

Marcadores de Metabolismo Ósseo em Potros da Raça Crioula em Diferentes Fases de Crescimento

Lessana de Moura Gonçalves¹, Daniela dos Santos Brum^{1,2}, Marcelo Marques Tusi³,
Cássio Marques Resmin⁴, Marcos da Silva Azevedo^{1,2}, Fabio Gallas Leivas^{1,2 *}

Artigo não publicado

***Short Communication para JEVS ou Veterinary Research Communications ou
Veterinary Research:***

¹Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Campus Uruguiana, Universidade Federal do Pampa.

²Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguiana, Universidade Federal do Pampa.

³Universidade Regional das Missões e Alto Uruguai- URI, Campus Santiago.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria.

*Corresponding: Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH), Curso de Medicina Veterinária, P.O. Box 118. BR 472, km 598, Uruguiana, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97.508-000. E-mail: fabioleivas@unipampa.edu.br

RESUMO

A integridade óssea dos potros é fundamental para o seu desenvolvimento saudável e desempenho atlético futuro. Na raça crioula, amplamente valorizada em diversas competições, as doenças ortopédicas do desenvolvimento representam um risco, podendo comprometer o potencial desses animais. Nesse cenário, o conhecimento aprofundado sobre os marcadores do metabolismo ósseo torna-se essencial para direcionar pesquisas voltadas à prevenção e manejo dessas enfermidades, contribuindo para a saúde e o desempenho da raça. A osteocalcina (OCN), refletindo a atividade osteoblástica, e o telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I (CTX-1), indicador de reabsorção óssea, são marcadores importantes para avaliar o turnover ósseo. O cobre, por sua vez, é essencial para a síntese de colágeno, fundamental para a integridade deste tecido ósseo. Este estudo investigou os níveis de OCN, CTX-I e cobre em potros crioulos para avaliar o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea durante a fase de desenvolvimento (até 1 ano). Amostras sanguíneas de potros ($n = 7$) foram coletadas aos 7 dias, 6 meses e 1 ano. OCN e CTX foram mensurados por ELISA, e o cobre por espectrometria de absorção atômica. A análise estatística (ANOVA) mostrou variações significativas para CTX-I, osteocalcina (OCN) e cobre. O CTX-I aumentou significativamente entre 6 meses e 1 ano, indicando maior reabsorção óssea nessa fase. O cobre também apresentou aumento significativo ao longo do período, possivelmente devido à maior demanda por colágeno. A osteocalcina variou significativamente, com uma diminuição clara, refletindo a redução na formação óssea com o avanço da idade. Concluimos que o monitoramento de CTX-I, osteocalcina e cobre pode ser útil para avaliar o metabolismo ósseo e orientar o manejo de potros Crioulos.

Palavras-chave: Metabolismo ósseo; Potros Crioulos; Osteocalcina; CTX-I; Cobre; Desenvolvimento ósseo.

ABSTRACT

Bone integrity in foals is essential for their healthy development and future athletic performance. In the Criollo breed, highly valued in various competitions, developmental orthopedic diseases pose a risk that can compromise these animals' potential. In this context, an in-depth understanding of bone metabolism markers becomes crucial to guide research focused on the prevention and management of these diseases, contributing to the breed's health and performance. Osteocalcin (OCN), reflecting osteoblastic activity, and C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-1), an indicator of bone resorption, are important markers for evaluating bone turnover. Copper, in turn, is essential for collagen synthesis, which is fundamental for the integrity of bone tissue. This study investigated OCN, CTX-I, and copper levels in Criollo foals to assess the balance between bone formation and resorption during the developmental phase (up to 1 year). Blood samples from foals ($n = 7$) were collected at 7 days, 6 months, and 1 year. OCN and CTX were measured by ELISA, and copper by atomic absorption spectrometry. Statistical analysis (ANOVA) showed significant variations for CTX-I, osteocalcin (OCN), and copper. CTX-I significantly increased between 6 months and 1 year, indicating greater bone resorption during this phase. Copper also showed a significant increase over the period, possibly due to increased collagen demand. Osteocalcin varied significantly, with a clear decrease, reflecting reduced bone formation with age. We conclude that monitoring CTX-I, osteocalcin, and copper may be useful in evaluating bone metabolism and guiding the management of Criollo foals.

Keywords: Bone metabolism; Criollo Foals; Osteocalcin; CTX-I; Copper; Bone development.

17. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica, submetida a um processo contínuo de remodelação ao longo da vida. Esse processo envolve um equilíbrio delicado entre a formação e a reabsorção óssea, ocorrendo em diferentes taxas conforme as necessidades do organismo (Shetty et al., 2016). Marcadores ósseos são enzimas derivadas de células ósseas ou são componentes da matriz liberados na circulação durante a (re)modelagem do osso (Price, 1998).

Cerca de 90% da matriz extracelular óssea é constituída por colágeno tipo I, e os 10% restantes por proteínas não colágenas, como a osteocalcina, osteonectina e outras como alguns fatores de crescimento. Durante o metabolismo ósseo, reabsorção e síntese de tecido, são liberados à circulação fragmentos de moléculas de pró-colágenos (durante a síntese) e colágenos (durante a reabsorção) que, atualmente, podem ser dosificados em soro, plasma ou urina, por técnicas de imunoensaio (Vargas, Audí and Carrascosa, 1997).

Além das moléculas colágenas, pró colágenas e proteínas não colágenas, temos o cobre como um cofator essencial para várias enzimas que desempenham papéis cruciais no metabolismo ósseo, sendo uma delas a lisil oxidase (LOX). A LOX, uma enzima dependente de cobre, que é fundamental para a modificação da matriz extracelular óssea, especialmente por catalisar a ligação cruzada entre colágeno e elastina (Zhang et al., 2024).

É essencial assegurar um desenvolvimento ósseo adequado e minimizar a ocorrência de distúrbios esqueléticos em equinos, uma vez que tais problemas resultam em considerável morbidade e perdas econômicas significativas (Inoue et al., 2008). Para reduzir a incidência dessas lesões, torna-se fundamental o monitoramento contínuo da qualidade óssea por meio de métodos não invasivos. Atualmente, o uso de marcadores bioquímicos circulantes oferece uma ferramenta valiosa para a avaliação em tempo real do metabolismo ósseo, permitindo o acompanhamento da atividade das células ósseas de forma precisa e eficiente (Inoue et al., 2008).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea nas primeiras fases de desenvolvimento de potros da raça crioula, compreendendo melhor a dinâmica destes marcadores. Para isso foram mensurados os níveis de osteocalcina (OCN), telopeptídeo de ligação cruzada carboxi-terminal do colágeno tipo I, também chamado telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I (CTX-I) e cobre.

18. MÉTODOS

Foram utilizados no trabalho 7 (sete) potros da Raça Crioula, os quais foram criados em um estabelecimento situados na região de Uruguaiana (coordenadas geográficas - 29.984116187400605, -57.01149389135508) e tiveram seu nascimento entre agosto e outubro de 2022, criadas extensivamente em campo nativo, sendo sua flora nativa baseada em 21 espécies que apresentam potencial forrageiro, sendo as Poaceae com maior número de espécies identificadas, seguida pela Fabaceae e Amaranthaceae (de Oliveira et al., 2009), com água *ad libitum*. Todos os potros foram provenientes de partos eutócicos e não apresentaram nenhuma alteração clínica e metabólica. No momento das coletas sanguíneas esses potros eram avaliados para presença de alterações ortopédicas ou de saúde em geral. Esses animais seguiram o programa de tratamento antiparasitário e de vacinas, conforme manejo da propriedade.

As coletas sanguíneas foram realizadas em três momentos distintos, sendo a primeira aos sete dias de vida, a segunda aos 180 dias e a última com 1 ano de idade. As amostras foram coletadas no turno da manhã, em tubo sem EDTA, através de punção da veia jugular. Posteriormente as amostras foram acondicionadas em isopor com gelo reciclável, sendo encaminhadas ao laboratório em até quatro horas. As amostras foram centrifugadas a 2200 rpm por 20 minutos a uma temperatura de 24 °C e o soro armazenado em microtubos. Posterior a este procedimento, foram colocadas em freezer a -80°C até mensuração do biomarcador sérico (Thrall, 2007).

A mensuração de CTX-I e Ocn foram obtidas através de imunoensaio enzimático, utilizado o equipamento Leitor de ELISA e Fotômetro de Microplacas Multiskan FC (Thermo Fisher Cientific). O kit utilizado para detecção de CTX-I em equinos foi Serum CrossLaps (CTX-I) ELISA - Immunodiagnostic Systems Limited ids® contendo 96 poços e calibração do ensaio com seis pontos de curva e faixa de detecção de 0 – 2,494 ng/mL, sendo as análises realizadas conforme as instruções do fabricante. A diluição da mostra foi feita na proporção de uma alíquota de soro para uma de tampão salino tamponado com fosfato (PBS) totalizando uma diluição final 1/2, respeitando a sensibilidade do kit e os valores de referência em equinos (Kamr et al., 2020; Lepage et al., 2001). A osteocalcina (Ocn) foi mensurada através do kit MicroVue Osteocalcin EIA Kit Quidel® contendo 96 poços e a precisão dentro da execução e entre as execuções foi determinada por meio do ensaio de três amostras de soro e faixa de detecção mínima de 0.45 ng/mL, sendo as análises realizadas conforme as instruções do fabricante. A diluição da mostra foi feita na proporção de uma alíquota de soro para uma de

tampão salino tamponado com fosfato (PBS) totalizando uma diluição final 1/2, respeitando a sensibilidade do kit e os valores de referência em equinos (Inoue et al., 2008). A mensuração do cobre foi obtida através de espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), na diluição de 1:3 de ácido nítrico e ácido perclórico para a digestão da amostra utilizando como referencial a técnica de Santarém, 2004. Na digestão foi utilizado 1,0 mL de soro equino. A solução foi levada ao bloco digestor por tempo determinado e os extratos ácidos obtidos após a mineralização das amostras foram transferidos para tubo de ensaio graduado, acertando-se o volume final com água destilada na quantidade suficiente para 5,0 mL. As concentrações foram descritas em mg/L e os valores de referência utilizados segundo literatura (Santarém, 2004; Stahl et al., 2024).

18.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos níveis dos marcadores osteocalcina (OCN), telopetídeo C-terminal do colágeno tipo I (CTX-I) e cobre nas três diferentes idades (7 dias, 6 meses e 1 ano), foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) unidirecional seguida de pós-teste de Tukey. Os valores para as três idades foram comparados para cada marcador, a fim de identificar variações significativas ao longo do desenvolvimento dos potros. O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

19. RESULTADOS

As figuras 1,2 e 3 a seguir mostram os diferentes valores dos marcadores em relação a faixa etária dos animais, onde a figura 1 apresenta a distribuição dos níveis de osteocalcina (ng/mL) em três grupos de idade: 7 dias, 6 meses e 1 ano. Os valores médios são representados no gráfico: 91,740 ng/mL para 7 dias, 71,841 ng/mL para 6 meses e 55,991 ng/mL para 1 ano. As caixas representam o intervalo interquartil (IQR), e os bigodes indicam a amplitude dos dados, os outliers, que são representados como pontos fora da faixa do IQR."

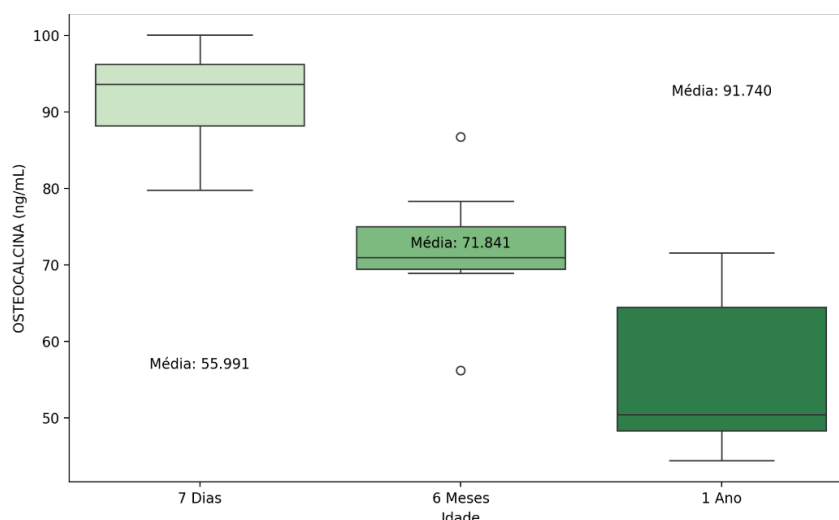


Figura 1 - Valores de osteocalcina por idade em potros.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que os níveis de osteocalcina (OCN) apresentaram variação significativa ($F=27,12$, $p<0,001$), refletindo uma intensa atividade osteoblástica entre 7 dias e 6 meses, seguida por uma estabilização aos 12 meses, o que indica uma diminuição na formação óssea conforme os potros crescem.

A figura 2 traz a distribuição dos níveis de cobre (mg/L) em potros ao longo de três faixas etárias: 7 dias, 6 meses e 1 ano. A mediana e os quartis de cada grupo etário são representados pelas caixas, com a média dos valores indicada diretamente no gráfico: 0,907 mg/L aos 7 dias, 1,155 mg/L aos 6 meses e 0,368 mg/L ao 1 ano. Os bigodes ilustram a dispersão dos dados, com um outlier identificado no grupo de 7 dias.

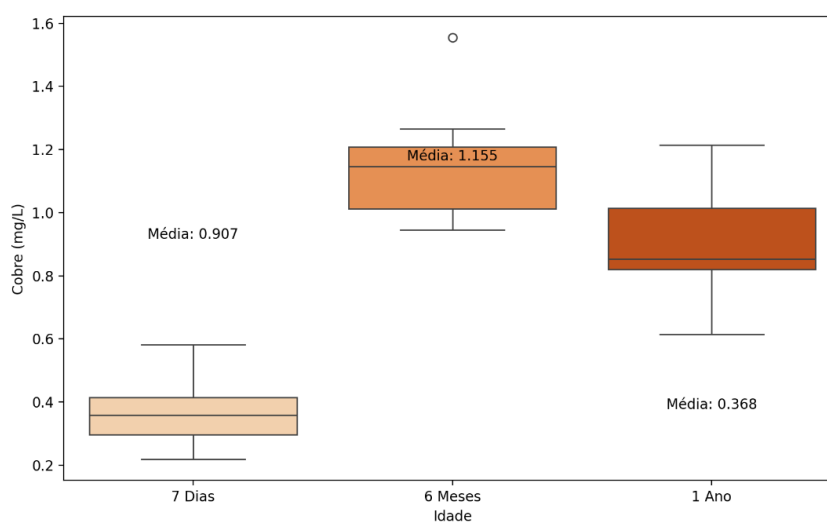


Figura 2 - Valores de cobre por idade em potros.

No caso do cobre, houve uma variação significativa entre as idades ($F=34,67$, $p<0,001$), com um aumento progressivo ao longo do desenvolvimento. Esse aumento pode estar associado a uma maior síntese de colágeno e à demanda metabólica relacionada ao crescimento ósseo e à integridade estrutural.

Já a figura 3 ilustra a variação dos níveis de CTX em potros com 7 dias, 6 meses e 1 ano de idade. A média para cada grupo é apresentada no gráfico: 0,217 ng/mL aos 7 dias, 0,179 ng/mL aos 6 meses, e 0,156 ng/mL ao 1 ano. As caixas representam o intervalo interquartil, enquanto os bigodes indicam a amplitude total dos dados, sem outliers aparentes."

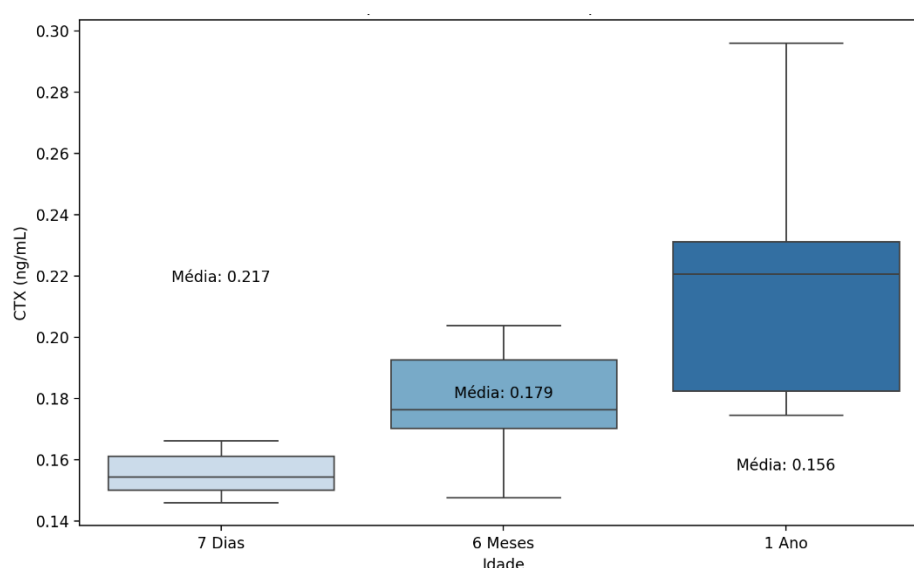


Figura 3 - Valores de CTX-I por idade em potros.

A análise de variância (ANOVA) mostrou variação significativa para o CTX-I entre as idades ($F=8,83$, $p=0,002$), com o aumento mais acentuado ocorrendo entre 6 meses e 1 ano. Esse aumento sugere um incremento na reabsorção óssea ao longo do desenvolvimento dos potros.

A análise de pós teste de comparações múltiplas de Tukey revelou variações significativas nos três marcadores. Em relação à osteocalcina, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre todas as idades avaliadas. Entre 7 dias e 6 meses ($p = 0,0019$), bem como entre 7 dias e 1 ano ($p < 0,0001$), houve um aumento considerável nos níveis de osteocalcina, refletindo uma maior atividade osteoblástica e, portanto, maior formação óssea nessas fases iniciais de desenvolvimento. Entre 6 meses e 1 ano ($p = 0,0116$), também se verificou uma diferença significativa, indicando que, embora a formação óssea diminua, ela ainda ocorre de forma ativa durante o primeiro ano de vida.

Em relação ao cobre, entre 7 dias e 6 meses, bem como entre 7 dias e 1 ano, os aumentos foram significativos ($p < 0,0001$), sugerindo uma demanda crescente por colágeno, essencial para a estrutura óssea, conforme os potros crescem. A diferença entre 6 meses e 1 ano também foi significativa ($p = 0,0486$), indicando que o aumento nos níveis de cobre continua durante o primeiro ano de vida, possivelmente devido à intensificação da síntese de colágeno e ao aumento do metabolismo ósseo.

Por outro lado, os resultados para o CTX-I indicaram que não houve diferença significativa entre os níveis de reabsorção óssea entre 7 dias e 6 meses ($p = 0,2731$) ou entre 6 meses e 1 ano ($p = 0,484$). No entanto, houve uma variação significativa entre 7 dias e 1 ano ($p = 0,0016$), o que sugere que a reabsorção óssea se intensifica substancialmente durante o primeiro ano de vida, sendo melhor visualizada neste maior intervalo de tempo.

20. DISCUSSÃO

Os níveis de CTX-I, que refletem a reabsorção óssea, aumentaram progressivamente ao longo do desenvolvimento. Esse aumento progressivo nos níveis de CTX-I sugere uma intensificação da reabsorção óssea conforme a idade dos potros, o que é esperado durante fases de crescimento acelerado, conforme discutido por (Kamr et al., 2020; Shetty et al., 2016).

A osteocalcina, um marcador de formação óssea, apresentou uma tendência de declínio com o avanço da idade. Essa queda nos níveis de osteocalcina é consistente com a desaceleração da formação óssea à medida que os potros se aproximam da maturidade esquelética, conforme observado por (Inoue et al., 2008; Price et al., 1995).

Os níveis de cobre aumentaram de forma marcante entre os períodos de 7 dias e 6 meses, esses resultados estão em concordância com o papel essencial do cobre na formação de colágeno e no metabolismo ósseo, conforme descrito por (Zhang et al., 2024). O aumento significativo nos níveis de cobre sugere uma demanda metabólica crescente durante a fase de rápido crescimento ósseo, enquanto a ligeira diminuição observada após 12 meses pode refletir um ajuste homeostático relacionado à maturação óssea.

Esses resultados indicam que os processos de formação e reabsorção óssea, além do metabolismo de cobre, variam de forma marcante nas diferentes fases do desenvolvimento dos potros, sendo informações essenciais para o manejo e monitoramento da saúde óssea em equinos jovens.

21. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os níveis de osteocalcina diminuíram com a idade, enquanto que os níveis de CTX aumentaram, refletindo o equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea. Esses resultados ressaltam a importância de monitorar os marcadores de metabolismo ósseo para otimizar o manejo do desenvolvimento esquelético em potros da raça crioula.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado com recursos do Laboratório BIOTECH/UNIPAMPA, PROPPI/UNIPAMPA (Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Pampa) e foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil - Código financeiro 001. Os autores agradecem ao Laboratório GEPACES, DBR Biotech, Brasil, pelo fornecimento de dados e informações.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Os financiadores não tiveram qualquer influência no delineamento do estudo, na coleta de dados, nos processos de análise e interpretação, na redação do manuscrito ou na decisão de publicar os resultados.

Aprovação do Comitê De Bioética e Biossegurança

Para todos os fins, os autores do artigo " Marcadores de Metabolismo Ósseo em Potros da Raça Crioula em Diferentes Fases de Crescimento" declaram que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIPAMPA, sob o protocolo n. 034/2021.

22. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. L. Fowden, A. J. Forhead, K. L. White, & P. M. Taylor. (2000). *Equine uteroplacental metabolism at mid- and late gestation*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.2000.02067.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.2000.02067.x)
- A.L.Fowden, P.M.Taylor, K.L.White, & A.J.Forhead. (2000). Ontogenic and nutritionally induced changes in fetal metabolism in the horse. *Journal of Physiology*.
- Allen, M. J. (2003). Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(3), 101–113. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2003.tb00323.x>
- Amaral, L. A., Marchiori, M., Moraes, B. S., Finger, I., Santos, R. S. dos, & Nogueira, C. E. W. (2017). Relação entre adiposidade, perfil energético, proteínas inflamatórias e lesões osteoarticulares em equinos jovens sobre diferentes sistemas de criação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(2), 115–120. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000200004>
- Arner, E., Forrest, A. R. R., Ehrlund, A., Mejhert, N., Itoh, M., Kawaji, H., Lassmann, T., Laurencikienė, J., Rydén, M., & Arner, P. (2014). Ceruloplasmin Is a Novel Adipokine Which Is Overexpressed in Adipose Tissue of Obese Subjects and in Obesity-Associated Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(3), e80274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080274>
- Bazzano, M., Giannetto, C., Fazio, F., Arfuso, F., Giudice, E., & Piccione, G. (2014). Metabolic profile of broodmares during late pregnancy and early post-partum. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 49(6), 947–953. <https://doi.org/10.1111/rda.12411>
- Becht, J. L., & Park, R. D. (2000). *A Review of Selected Normal Radiographic Variations of the Equine Fetlock, Carpus, Tarsus and Stifle*.
- Belli, C. B., Fernandes, W. R., Torres, L. N., Sucupira, M. C. A., de Sá, L. R. M., Maiorka, P. C., Neuenschwander, H. M., de Barros, A. de M. C., & Baccarin, R. Y. A. (2021). Copper Toxicity in Horses: Does it Exist? *Journal of Equine Veterinary Science*, 106. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103752>

- Bruynsteen, L., Erkens, T., Peelman, L. J., Ducatelle, R., Janssens, G. P., Harris, P. A., & Hesta, M. (2013). Expression of inflammation-related genes is associated with adipose tissue location in horses. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 240. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-240>
- Burns, T. A., Geor, R. J., Mudge, M. C., McCutcheon, L. J., Hinchcliff, K. W., & Belknap, J. K. (2010). Proinflammatory Cytokine and Chemokine Gene Expression Profiles in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Depots of Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Light Breed Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(4), 932–939. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0551.x>
- Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R., & Burn, P. (1995). Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. *Science*, 269(5223), 546–549. <https://doi.org/10.1126/science.7624778>
- Canisso, I. F., Ball, B. A., Cray, C., Williams, N. M., Scoggin, K. E., Davolli, G. M., Squires, E. L., & Troedsson, M. H. (2014). Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72(4), 376–385. <https://doi.org/10.1111/aji.12278>
- Carolyn Cray, Julia Zaias, & Norman H Altman. (2009). *Assays of Acute Phase Proteins*.
- Carter, R. A., Geor, R. J., Burton Staniar, W., Cubitt, T. A., & Harris, P. A. (2009). Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Veterinary Journal*, 179(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.029>
- Cavinder, C. A., Vogelsang, M. M., Gibbs, P. G., Forrest, D. W., & Schmitz, D. G. (2007). Endocrine Profile Comparisons of Fat Versus Moderately Conditioned Mares Following Parturition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(2), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.12.004>
- Chavatte-Palmer, P., & Robles, M. (2019). *Developmental programming: Can nutrition of the mare influence the foal's health? Programação de desenvolvimento embrionário: A nutrição da égua pode influenciar a saúde do potro?* October. <https://www.researchgate.net/publication/336278296>

- Coleman, R. E. (2002). The clinical use of bone resorption markers in patients with malignant bone disease. *Cancer*, 94(10), 2521–2533. <https://doi.org/10.1002/cncr.10522>
- Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., & Garg, R. (2005). Metabolic Syndrome. *Circulation*, 111(11), 1448–1454. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000158483.13093.9D>
- Davies Morel, M. C. G., Newcombe, J. R., & Holland, S. J. (2002). Factors affecting gestation length in the Thoroughbred mare. *Animal Reproduction Science*, 74(3–4), 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00171-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00171-9)
- de Araújo, J. M., & de Oliveira, R. A. (2018). A influência da nutrição e a atuação da leptina e kisspeptina no ciclo reprodutivo da égua. In *Rev. Bras. Reprod. Anim* (Issue 1). www.cbpa.org.br
- Denko, C. W. (1979). Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents and Actions*, 9(4), 333–336. <https://doi.org/10.1007/BF01970657>
- Denoix, J. M., Jacquet, S., Lepeule, J., Crevier-Denoix, N., Valette, J. P., & Robert, C. (2013). Radiographic findings of juvenile osteochondral conditions detected in 392 foals using a field radiographic protocol. *Veterinary Journal*, 197(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.040>
- Desjardins, M. R., & Hurtig, M. B. (1990). Cartilage healing: A review with emphasis on the equine model. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 31(8), 565–572.
- Dobbs, T. N., Foote, C. E., Cawdell-Smith, A. J., Anderson, S. T., Boston, R. C., & Bryden, W. L. (2012). *Glucose and insulin dynamics in mares and their foals*.
- Doguer, C., Ha, J., & Collins, J. F. (2018). Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1433–1461). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170045>
- Dugdale, A. H. A., Curtis, G. C., Harris, P. A., & Argo, C. M. (2011). Assessment of body fat in the pony: Part I. Relationships between the anatomical distribution of adipose tissue, body composition and body condition. *Equine Veterinary Journal*, 43(5), 552–561. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00330.x>

- Eckersall, P. D., & Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. In *Veterinary Journal* (Vol. 185, Issue 1, pp. 23–27). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.009>
- Eisele, I., Wood, I. S., German, A. J., Hunter, L., & Trayhurn, P. (2005). Adipokine Gene Expression in Dog Adipose Tissues and Dog White Adipocytes Differentiated in Primary Culture. *Hormone and Metabolic Research*, 37(8), 474–481. <https://doi.org/10.1055/s-2005-870325>
- El-maaty, A. M. A., Mohamed, A. H., Abu-aita, N. A., & Morgan, H. M. (2017). Markers for Predicting Overweight or Obesity of Broodmares Journal of Equine Veterinary Science Markers for Predicting Overweight or Obesity of Broodmares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 56(December 2017), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.04.002>
- Fang, H., & Judd, R. L. (2018). Adiponectin regulation and function. *Comprehensive Physiology*, 8(3), 1031–1063. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170046>
- Fowden, A. L. (1997). Comparative aspects of fetal carbohydrate metabolism. In *Equine veterinary journal. Supplement* (Issue 24, pp. 19–25). <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb05074.x>
- Fowden, A. L., Barnes, R. J., Comline, R. S., & Silver, M. (n.d.). *PANCREATIC β -CELL FUNCTION IN THE FETAL FOAL AND MARE*.
- Fowden, A. L., Giussani, D. A., & Forhead, A. J. (2019). Physiological development of the equine fetus during late gestation. *Equine Veterinary Journal*, 165–173. <https://doi.org/10.1111/evj.13206>
- Fowden, A. L., Ralph, M. M., & Silver, M. (1994a). Nutritional regulation of uteroplacental prostaglandin production and metabolism in pregnant ewes and mares during late gestation. In *Exp Clin Endocrinol* (Vol. 102).
- Fowden, A. L., Ralph, M. M., & Silver, M. (1994b). Nutritional regulation of uteroplacental prostaglandin production and metabolism in pregnant ewes and mares during late gestation. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 102(03), 212–221. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211285>

- Freinkel N, Metzger BE, & Nitzan M. (1974). Facilitated anabolism in late pregnancy: some novel maternal compensations for accelerated starvation. *Proceedings of the VIIIth Congress of the International Diabetes Federation*.
- Fukao, T., Lopaschuk, G. D., & Mitchell, G. A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: On the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70(3), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.11.001>
- Gamucci, O., Lisi, S., Scabia, G., Marchi, M., Piaggi, P., Duranti, E., Viridis, A., Pinchera, A., Santini, F., & Maffei, M. (2012). Haptoglobin deficiency determines changes in adipocyte size and adipogenesis. *Adipocyte*, 1(3), 142–183. <https://doi.org/10.4161/adip.20041>
- Gastal, M. O., Gastal, E. L., Spinelli, V., & Ginther, O. J. (2004). *Relationships between body condition and follicle development in mares 1*. 115–121.
- Gentry, L. R., Thompson, D. L., Gentry, G. T., Del Vecchio, R. P., Davis, K. A., & Del Vecchio, P. M. (2004). The relationship between body condition score and ultrasonic fat measurements in mares of high versus low body condition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 24(5), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2004.04.009>
- George, L. A., Staniar, W. B., Cubitt, T. A., Treiber, K. H., Harris, P. A., & Geor, R. J. (2011). Evaluation of the effects of pregnancy on insulin sensitivity, insulin secretion, and glucose dynamics in Thoroughbred mares. *American Journal of Veterinary Research*, 72(5), 666–674. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.5.666>
- Girardi, F. M., da Fonseca, L. A., Ribeiro Filho, J. D., Souto, P. C., Ferreira, D. A. C., Dornelas, L. R. S. M., Bento, L. D., & de Carvalho Filho, W. P. (2019). Influence of Obesity on Serum Concentrations of Acute-Phase Proteins in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102810>
- Gonçalves, L. M., Pozzobon, R., dos Anjos, B. L., Pellegrini, D. C. P., Azevedo, M. S., Dau, S. L., Oliveira, G. P., & Klaus, R. (2019). Radiological evaluation of juvenile osteochondral conditions in Brazilian warmblood horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 102844. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102844>
- Grøndahl, A. M., & Engeland, A. (1995). Influence of radiographically detectable orthopedic changes on racing performance in standardbred trotters. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.

- Healy, J., & Tipton, K. (2007). Ceruloplasmin and what it might do. *Journal of Neural Transmission*, 114(6), 777–781. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0687-7>
- Henneke, D. R., Potter, G. D., & Kreider, J. L. (1984). Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, 21(6), 897–909. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90383-2)
- HENNEKE, D. R., POTTER, G. D., KREIDER, J. L., & YEATES, B. F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 371–372. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>
- Henneke, D. R., Potter, G. D., Kreider, J. L., & Yeates, B. F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 371–372. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>
- Hines, K. K., Potter, G. D., & Harms, P. G. (1987). *RELATIONSHIP BETWEEN BODY CONDITION AND LEVELS OF SERUM LUTEALIZING*. 28(6), 815–825.
- Hultén, C., Tulamo, R.-M., Suominen, M. M., Burvall, K., Marhaug, G., & Forsberg, M. (1999). A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 68(2–4), 267–281. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00027-6)
- Inoue, Y., Matsui, A., Asai, Y., Aoki, F., Yoshimoto, K., Matsui, T., & Yano, H. (2008). Response of Biochemical Markers of Bone Metabolism to Exercise Intensity in Thoroughbred Horses. In *Equine Sci* (Vol. 19, Issue 4).
- Jacobsen, S., & Andersen, P. H. (2007). The acute phase protein serum amyloid a (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education*, 19(1), 38–46. <https://doi.org/10.2746/095777307X177235>
- Jain, S., Gautam, V., & Naseem, S. (2011). Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 118. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76489>

- Jellyman, J., Valenzuela, O., & Fowden, A. (2015). *Glucocorticoid programming of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and metabolic function: Animal studies from mouse to horse*.
- Jerry Kaneko, J., Harvey, J. J., & Bruss, M. L. (2008). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3>
- Kamr, A. M., Dembek, K. A., Gilsenan, W., Bozorgmanesh, R., Hassan, H. Y., Rosol, T. J., & Toribio, R. E. (2020). C-terminal telopeptide of type I collagen, osteocalcin, alkaline phosphatase, and parathyroid hormone in healthy and hospitalized foals. *Domestic Animal Endocrinology*, 72. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106470>
- Kane, A. J., Mcilwraith, ; C Wayne, Park, R. D., Rantanen, N. W., Morehead, J. P., & Bramlage, L. R. (2000). *The Effect of Radiograaphic Changes in Thoroughbred Yearlings on Future Racing Performance*.
- Kaneko, J. J. , H. J. W. , B. M. L. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3>
- Kearns, C. F., McKeever, K. H., Roegner, V., & al., et. (2006). Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. *Vet J*, 172, 460–465.
- Kim, O. Y., Shin, M. J., Moon, J., & Chung, J. H. (2011). Plasma ceruloplasmin as a biomarker for obesity: A proteomic approach. *Clinical Biochemistry*, 44(5–6), 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.01.014>
- Kubiak, J. R., Evans, J. W., Potter, G. D., Harms, P. G., & Jenkins, W. L. (1988). Parturition in the multiparous mare fed to obesity. *Journal of Equine Veterinary Science*, 8(2), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(88\)80035-2](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(88)80035-2)
- Lawrence, L., DiPietro, J., Ewert, K., Parrett, D., Moser, L., & Powell, D. (1992). CHANGES IN BODY WEIGHT AND CONDITION OF GESTATING MARES. *JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE*.
- Lazalde, B., Huerta-Guerrero, H. M., Simental-Mendía, L. E., Rodríguez-Morán, M., & Guerrero-Romero, F. (2014). Haptoglobin 2-2 Genotype Is Associated with TNF- α and IL-6 Levels in Subjects with Obesity. *Disease Markers*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/912756>

- Lecocq, M., Girard, C. A., Fogarty, U., Beauchamp, G., Richard, H., & Laverty, S. (2008). Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: Early events on the pathway to equine osteochondrosis? *Equine Veterinary Journal*, 40(5), 442–454. <https://doi.org/10.2746/042516408X297453>
- Lepage, O. M., Carstanjen, B., & Uebelhart, D. (2001). Non-Invasive Assessment of Equine Bone: An Update. *The Veterinary Journal*, 161(1), 10–23. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0541>
- Lepage, O. M., Hartmann, D. J., Eicher, R., Uebelhart, B., Tschudi, P., & Uebelhart, D. (1998). Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses. *Veterinary Journal*, 156(3), 169–175. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(98\)80120-2](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(98)80120-2)
- Lepeule, J., Bareille, N., Valette, J. P., Seegers, H., Jacquet, S., Denoix, J. M., & Robert, C. (2008). Developmental orthopaedic disease in limbs of foals: between-breed variations in the prevalence, location and severity at weaning. *Animal*, 2(2), 284–291. <https://doi.org/10.1017/S1751731107001024>
- Levy, A. P., Asleh, R., Blum, S., Levy, N. S., Miller-Lotan, R., Kalet-Litman, S., Anbinder, Y., Lache, O., Nakhoul, F. M., Asaf, R., Farbstein, D., Pollak, M., Soloveichik, Y. Z., Strauss, M., Alshiek, J., Livshits, A., Schwartz, A., Awad, H., Jad, K., & Goldenstein, H. (2010). Haptoglobin: Basic and Clinical Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(2), 293–304. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2793>
- Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R., & Lechler, R. I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394(6696), 897–901. <https://doi.org/10.1038/29795>
- Marchiori, M. O., Kasinger, S., Silva, K. R., Souza, L. S., Amaral, L. A., Nogueira, C. E. W., & Roll, V. F. B. (2015). Medidas comparativas do padrão morfométrico e perfil energético de éguas Crioulas no terço final da gestação, com diferentes escores corporais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67(3), 707–715. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7705>
- Morgan, J. W. (2013). *How to Take Radiographs of the Metacarpophalangeal/Metatarsophalangeal Joint ...In: Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP, 2013 - Nashville, TN, USA.* <http://www.ivis.org>

- Murata, H., Shimada, N., & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *Veterinary Journal*, 168(1), 28–40. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9)
- Nabi, G., Amin, M., Khan, A., & Kamil, M. (2014). Endogeneous Signals and Mammalian Puberty Onset: A Review. *Journal of Biology and Life Science*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.5296/jbls.v6i1.6032>
- Nathanielsz, P. W. (2006a). Animal Models That Elucidate Basic Principles of the Developmental Origins of Adult Diseases. *ILAR Journal*, 47(1), 73–82. <https://doi.org/10.1093/ilar.47.1.73>
- Nathanielsz, P. W. (2006b). *Animal Models That Elucidate Basic Principles of the Developmental Origins of Adult Diseases*.
- Orford, N., Cattigan, C., Brennan, S. L., Kotowicz, M., Pasco, J., & Cooper, D. J. (2014). The association between critical illness and changes in bone turnover in adults: a systematic review. *Osteoporosis International*, 25(10), 2335–2346. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2734-1>
- Ousey, J. C., Fowden, A. L., Wilsher, S., & Allen, W. R. (2008). The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foals. *Equine Veterinary Journal*, 40(7), 673–679. <https://doi.org/10.2746/042516408X322175>
- Panchal, M. T., Gujarati, M. L., & Kavani, F. S. (1995). Study of some of the reproductive traits of Kathi mares in Gujarat state. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 16(1), 47–49.
- Pazinato, F. M., Curcio, B. da R., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Wendt, C. G., Moreira, F., Schmit, R. A., & Nogueira, C. E. W. (2019). Immunolocalization of Leptin and its Receptor (ObR-b) in Equine Placenta at Term and Plasma Level Measurement in the Late Gestation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.03.008>
- Pereira De Melo, U., Silveira Palhares, M., Arabicano Gheller, V., Monteiro Da, J., Filho, S., Ferreira, C., Oliveira, F., & Leme, P. (2011). RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS À INANIÇÃO EM EQUINOS [Equine neuroendocrine responses to starvation]. In *Acta Veterinaria Brasilica* (Issue 1).

- Pereira, S. (2007). Efeito da desnutrição na resposta imune ao stress. *NUTRÍCIAS*.
- Platt, H. (1984). Growth of the equine foetus. In *Equine Veterinary Journal* (Vol. 16, Issue 4, pp. 247–252). <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1984.tb01920.x>
- Prestes, N. C., & Landim-Alvarenga, F. C. (2017). *Obstetrícia Veterinária, 2ª edição*.
- Price, J. S. (1998). Biochemical markers of bone metabolism in horses: potentials and limitations? In *Veterinary journal (London, England : 1997)* (Vol. 156, Issue 3, pp. 163–165). W.B. Saunders. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(98\)80117-2](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(98)80117-2)
- PRICE, J. S., JACKSON, B., EASTELL, R., GOODSHIP, A. E., BLUMSOHN, A., WRIGHT, I., STONEHAM, S., LANYON, L. E., & RUSSELL, R. G. G. (1995). Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Equine Veterinary Journal*, 27(3), 201–207. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1995.tb03063.x>
- Puchkova, L. V., Babich, P. S., Zatulovskaia, Y. A., Ilyechova, E. Y., & Sole, F. Di. (2018). Copper metabolism of newborns is adapted to milk ceruloplasmin as a nutritive source of copper: Overview of the current data. In *Nutrients* (Vol. 10, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu10111591>
- R. G. Westervelt, J. R. Stouffer, H. F. H. and H. F. S. (1976). Estimating fatness in horses. *Proc. 10th Eq. Nutr. and Physiol. Symp.*, 4(4), 127–131.
- Ricci, R., & Bevilacqua, F. (2012). The potential role of leptin and adiponectin in obesity: A comparative review. *The Veterinary Journal*, 191(3), 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.04.009>
- Robles, M., Hammer, C., Staniar, B., & Chavatte-Palmer, P. (2021). Nutrition of Broodmares. In *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* (Vol. 37, Issue 1, pp. 177–205). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2021.01.001>
- Robles, M., Nouveau, E., Gautier, C., Mendoza, L., Dubois, C., Dahirel, M., Lagofun, B., Aubrière, M. C., Lejeune, J. P., Caudron, I., Guenon, I., Viguié, C., Wimel, L., Bouraima-Lelong, H., Serteyn, D., Couturier-Tarrade, A., & Chavatte-Palmer, P. (2018). Maternal obesity increases insulin resistance, low-grade inflammation and osteochondrosis lesions in foals and yearlings until 18 months of age. *PLoS ONE*, 13(1), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190309>

Romero, C. E. M., & Zanesco, A. (2006). O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. In *Revista de Nutrição* (Vol. 19, Issue 1, pp. 85–91). Revista de Nutrição. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732006000100009>

Rosa Neto, N. S., & Carvalho, J. F. de. (2009). O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 49(4), 413–430. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042009000400008>

R.W. Quinn, A.O. Burk, J. K. S. and T. G. H. (2006). Equine Obesity: Implications for health and strategies for control. *4th MID-ATLANTIC NUTRITION CONFERENCE*.

Santarém, C. (2004). *Valores séricos de macro e microminerais de equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI), do nascimento aos seis meses de idade*. <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/252f70c8-434b-4e33-ae6f-29cc284f6d25/content>

Santschi, E. M. (2013). *How to Interpret Radiographs of the Stifle Joint of the Young Performance Horse*. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP, 2013 - Nashville, TN, USA*. <http://www.ivis.org>

Santschi, E. M. (2014). *How to Interpret Radiographs of the Carpus and Tarsus of the Young Performance...*In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP, 2013 - Nashville, TN, USA*. <http://www.ivis.org>

Saremi, B., Al-Dawood, A., Winand, S., Müller, U., Pappritz, J., von Soosten, D., Rehage, J., Dänicke, S., Häussler, S., Mielenz, M., & Sauerwein, H. (2012). Bovine haptoglobin as an adipokine: Serum concentrations and tissue expression in dairy cows receiving a conjugated linoleic acids supplement throughout lactation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146(3–4), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.03.011>

Scarpace, P. J., & Zhang, Y. (2009). Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(3), R493–R500. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90669.2008>

- Schuler, G., Fürbass, R., & Klisch, K. (2018). Placental contribution to the endocrinology of gestation and parturition. *Animal Reproduction*, 15(Irrs), 822–842. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0015>
- Segovia, S. A., Vickers, M. H., Zhang, X. D., Gray, C., & Reynolds, C. M. (2015). Maternal supplementation with conjugated linoleic acid in the setting of diet-induced obesity normalises the inflammatory phenotype in mothers and reverses metabolic dysfunction and impaired insulin sensitivity in offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1448–1457. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.013>
- Sessions-Bresnahan, D. R., Heuberger, A. L., & Carnevale, E. M. (2018). Obesity in mares promotes uterine inflammation and alters embryo lipid fingerprints and homeostasis. *Biology of Reproduction*, 99(4), 761–772. <https://doi.org/10.1093/biolre/iory107>
- Shetty, S., Kapoor, N., Bondu, J., Thomas, N., & Paul, T. (2016). Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20(6), 846. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.192914>
- Smith, G. D., Jackson, L. M., & Foster, D. L. (2002). Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology*, 57(1), 73–86. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00658-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00658-6)
- Stahl, L. T., Müller, A., Krohn, J., Büttner, K., & Wehrend, A. (2024). Article Serum concentrations of selenium, copper, and zinc in neonatal foals: Influence of failure of passive transfer and age-related changes. In *CVJ* (Vol. 65).
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 772–783. <https://doi.org/10.1038/nri1937>
- Torres, A. J., Nogueira, C. E. W., Mousquer, M. A., Jacobsen, T. K., Neves, A. P., & Bastiani, G. de. (2021). Prevalência de alterações radiológicas nas articulações do tarso em equinos com sobrepeso da raça crioula em manejo extensivo. *Research, Society and Development*, 10(8), e35610817185. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17185>
- Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiological Reviews*, 93(1), 1–21. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012>

- van de Sande-Lee, S., & Velloso, L. A. (2012). Disfunção hipotalâmica na obesidade. In *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* (Vol. 56, Issue 6, pp. 341–350). <https://doi.org/10.1590/S0004-27302012000600001>
- van Weyenberg, S., Buyse, J., Kalmar, I. D., Swennen, Q., & Janssens, G. P. J. (2013). Voluntary feed intake and leptin sensitivity in *ad libitum* fed obese ponies following a period of restricted feeding: a pilot study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(4), 624–631. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01300.x>
- Vargas, D. M., Audí, L., & Carrascosa, A. (1997). Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 43(4), 367–370. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000400016>
- Vick, M. M., Adams, A. A., Murphy, B. A., Sessions, D. R., Horohov, D. W., Cook, R. F., Shelton, B. J., & Fitzgerald, B. P. (2007). Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of Animal Science*, 85(5), 1144–1155. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-673>
- Vick, M. M., Murphy, B. A., Sessions, D. R., Reedy, S. E., Kennedy, E. L., Horohov, D. W., Cook, R. F., & Fitzgerald, B. P. (2008). Effects of systemic inflammation on insulin sensitivity in horses and inflammatory cytokine expression in adipose tissue. *American Journal of Veterinary Research*, 69(1), 130–139. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.1.130>
- Ytrehus, B., Carlson, C. S., & Ekman, S. (2007). Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. In *Veterinary Pathology* (Vol. 44, Issue 4, pp. 429–448). <https://doi.org/10.1354/vp.44-4-429>
- Zanatta, L. C. B., Boguszewski, C. L., Borba, V. Z. C., & Kulak, C. A. M. (2014). Osteocalcina, metabolismo energético e da glicose. In *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* (Vol. 58, Issue 5, pp. 444–451). Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. <https://doi.org/10.1590/0004-27300000003333>
- Zhang, Z., Tang, H., Du, T., & Yang, D. (2024). The impact of copper on bone metabolism. In *Journal of Orthopaedic Translation* (Vol. 47, pp. 125–131). Elsevier (Singapore) Pte Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2024.06.011>

23. DISCUSSÃO GERAL

A gestação equina exige um manejo nutricional cuidadoso para garantir tanto a saúde da égua quanto o desenvolvimento adequado do potro. Estudos demonstram que o ambiente intrauterino desempenha um papel fundamental na formação do fenótipo do potro, com impactos sobre sua saúde metabólica e osteoarticular (Bazzano et al., 2014; Chavatte-Palmer & Robles, 2019; Ousey et al., 2008). Cabe salientar que é muito importante monitorar de perto a condição corporal das éguas durante a gestação para prevenir alterações metabólicas, a fim de evitar que problemas sejam transmitidos ao potro. O manejo adequado da alimentação e suplementação, especialmente nos últimos meses da gestação, assegura o aporte necessário de nutrientes que influenciam diretamente o desenvolvimento do potro (Chavatte-Palmer & Robles, 2019).

A análise de marcadores bioquímicos oferece uma maneira não invasiva de monitorar a saúde metabólica tanto da mãe quanto do recém-nascido. Alguns marcadores fornecem dados sobre processos inflamatórios e metabólicos e permitem avaliar a atividade de formação e reabsorção óssea (Allen, 2003; Jain et al., 2011; Price et al., 1995; Ricci & Bevilacqua, 2012). Estudos demonstram que a mensuração de biomarcadores é uma abordagem eficiente para detectar precocemente alterações no metabolismo (Kamr et al., 2020; Girardi et al., 2019).

A avaliação radiológica de potros de alto desempenho tem sido comumente feita em diferentes raças (Denoix et al., 2013; Gonçalves et al., 2019; Grøndahl & Engeland, 1995; Kane et al., 2000; Torres et al., 2021). Esta prática tem apresentado como resultado, o diagnóstico de frequentes anormalidades, que muitas vezes são clinicamente silenciosas, mas são de interesse para compradores e vendedores de animais desta categoria (Santschi, 2014).

O presente estudo envolveu 17 potros da raça crioula, e os resultados sugerem que o manejo nutricional adequado durante a gestação pode influenciar significativamente os níveis de alguns marcadores moleculares após o parto. Os marcadores que tiveram resultados relevantes neste estudo, como ceruloplasmina, cobre, CTX-I e osteocalcina, demonstram a importância de utilizar ferramentas biomoleculares para avaliar a saúde e o desenvolvimento de éguas e potros.

A ceruloplasmina demonstrou que além desempenhar um aumento em sua produção em processos inflamatórios (Denko, 1979) seu efeito protetivo e carreador de cobre é

extremamente importante para a saúde do potro recém-nascido assim como já demonstrado em seres humanos (Puchkova et al., 2018).

Referente aos marcadores soro amiloide A e haptoglobina, embora não tenham mostrado alteração nas condições do experimento, eles continuam sendo bons parâmetros para muitas alterações (Canisso et al., 2014; Girardi et al., 2019; Jacobsen & Andersen, 2007). Assim como estes marcadores leptina e adiponectina não demonstraram diferentes expressões, apesar de serem bons marcadores energéticos conforme a literatura (Kearns et al., 2006), embora em nosso trabalho, mesmo as éguas superalimentadas não demonstraram alterações em seus níveis.

A validação de alguns marcadores do metabolismo ósseo ainda não está bem elucidada na literatura (Lepage et al., 2001). Embora dados de Osteocalcina, cobre, CTX-I revelam modificações em determinadas circunstâncias nos estudos até hoje demonstrados, PINP e PICP continuam sendo marcadores não tão aprofundados na literatura, necessitando mais estudos para definir valores de padrão em diferentes idades.

A análise dos três marcadores – CTX-I, osteocalcina (OCN) e cobre – revelou um equilíbrio dinâmico entre reabsorção, formação óssea e suporte estrutural ao longo do crescimento dos potros. O aumento progressivo dos níveis de CTX-I entre 6 meses e 1 ano sugere maior reabsorção óssea durante essa fase, um processo essencial para o remodelamento ósseo e adaptação estrutural, como descrito por Kamra et al. (2020) e Shetty et al. (2016). Por outro lado, a osteocalcina, que inicialmente apresentou níveis elevados aos 7 dias, diminuiu ao longo do tempo, refletindo a desaceleração da formação óssea conforme os potros se aproximam da maturidade esquelética, conforme relatado por Inoue et al. (2006) e Price et al. (2001). O cobre, um cofator essencial para a síntese de colágeno e fortalecimento da matriz óssea, apresentou um aumento significativo nos primeiros 6 meses, seguido por uma estabilização aos 12 meses, em linha com o que foi discutido por Zhang et al. (2024) sobre o papel crítico do cobre no desenvolvimento ósseo. Esses resultados destacam a importância do equilíbrio entre reabsorção, formação e suporte de colágeno durante o crescimento, reforçando a necessidade de monitorar esses marcadores para otimizar o manejo nutricional e promover um desenvolvimento ósseo saudável em potros.

A análise dos dados deste experimento revela possíveis correlações entre os níveis de cobre e a presença de alterações radiológicas, sugerindo uma possível associação biológica entre a concentração de cobre no organismo e o desenvolvimento de alterações ósseas detectáveis radiologicamente. Além disso, a quantidade de alterações observadas e a gravidade

dessas alterações também se mostram correlacionadas com o cobre, mostrando que o cobre desempenha um papel importante nas alterações osteoarticulares dos potros. Outro ponto relevante é a correlação moderada entre CTX-I e alterações radiológicas, o que pode indicar que esse biomarcador também pode ser um bom dado para prever alteração. Esses achados indicam que uma investigação mais aprofundada sobre o impacto dos níveis de cobre e outros marcadores biológicos, como CTX-I, pode fornecer uma compreensão mais clara dos mecanismos subjacentes às alterações ósseas radiológicas em potros.

Este estudo demonstrou a relevância do monitoramento cuidadoso das éguas durante a gestação e do acompanhamento dos potros nas fases iniciais da vida. A pesquisa destacou a importância de avaliar diferentes aspectos metabólicos e osteoarticulares, oferecendo uma visão mais completa sobre como o manejo nutricional e a condição das éguas podem impactar diretamente o desenvolvimento dos potros. Esses achados são fundamentais para otimizar práticas de manejo e melhorar a saúde e o desempenho futuro dos animais, proporcionando novas perspectivas para o acompanhamento e intervenção em criatórios de equinos.

24. CONCLUSÃO

A presente pesquisa demonstrou que o manejo nutricional das éguas durante a gestação e o período pós-parto influencia os marcadores moleculares tanto nas éguas quanto nos potros, com foco no metabolismo ósseo e na saúde neonatal. A relação entre a ceruloplasmina nas éguas e o metabolismo do cobre nos potros reforça a importância da condição materna no fornecimento adequado de cobre para o neonato, um elemento essencial para diversos processos metabólicos do potro, incluindo a síntese de colágeno e outras funções estruturais.

Além disso, os marcadores de metabolismo ósseo, como CTX-I, osteocalcina e cobre, mostraram-se indicadores eficazes para o acompanhamento do crescimento ósseo nos potros, embora não tenham apresentado correlação direta com as alterações radiológicas observadas.

Os marcadores inflamatórios, como soro amiloide A e haptoglobina, não apresentaram variações significativas nas condições experimentais, mas continuam sendo parâmetros relevantes para a avaliação de processos inflamatórios. Já os marcadores energéticos, como leptina e adiponectina, mantiveram-se estáveis, mesmo em éguas superalimentadas, sugerindo que a superalimentação não afeta diretamente esses indicadores.

Conclui-se que o monitoramento dos biomarcadores, especialmente os relacionados ao metabolismo ósseo, é uma ferramenta útil para o acompanhamento do desenvolvimento dos potros. No entanto, não foi possível estabelecer uma associação entre esses marcadores e as alterações osteoarticulares detectadas por exames radiológicos. Esses resultados contribuem para uma melhor compreensão do impacto do manejo nutricional materno sobre o desenvolvimento dos potros, oferecendo subsídios valiosos para a otimização das práticas de manejo em criatórios de equinos.

25. PERSPECTIVAS PARA O ESTUDO

Acompanhamento Longitudinal: Realizar um acompanhamento de longo prazo dos potros para avaliar como os marcadores moleculares e radiológicos, observados no início da vida, influenciam o desenvolvimento esquelético e metabólico ao longo do tempo, incluindo o desempenho atlético e a saúde geral.

Estudo de diferentes Biomarcadores: Investigar a inclusão de novos biomarcadores, além de osteocalcina, CTX-I, ceruloplasmina e cobre, que possam proporcionar uma visão mais abrangente do metabolismo ósseo e da saúde metabólica dos potros, especialmente marcadores associados a fatores de crescimento e desenvolvimento ósseo.

Padronização e mensuração de PINP e PICP: trabalhar na aquisição de kits específicos para os marcadores de formação óssea PINP (Propeptídeo N-terminal do Procolágeno Tipo I) e PICP (Propeptídeo C-terminal do Procolágeno Tipo I), a fim de estabelecer uma base de dados mais robusta sobre a formação óssea e ampliar a compreensão desses marcadores na avaliação não invasiva do metabolismo ósseo em potros.

Impacto do Manejo Nutricional: Explorar mais profundamente a relação entre diferentes regimes alimentares das éguas durante a gestação e o desenvolvimento metabólico e osteoarticular dos potros, buscando otimizar a suplementação de micronutrientes como o cobre e outros elementos essenciais para a saúde esquelética.

Aplicação em diferentes Raças e condições: Expandir o estudo para incluir diferentes raças equinas e condições ambientais, a fim de verificar a aplicabilidade dos achados a outras populações e circunstâncias, buscando padrões dos marcadores.

Desenvolvimento de Protocolos de Monitoramento Não Invasivo: Criar e validar protocolos de monitoramento baseado em marcadores moleculares, visando a detecção precoce de alterações.

26. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. L. Fowden, A. J. Forhead, K. L. White, & P. M. Taylor. (2000). *Equine uteroplacental metabolism at mid- and late gestation*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.2000.02067.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.2000.02067.x)
- A.L. Fowden, P.M.Taylor, K.L.White, & A.J.Forhead. (2000). Ontogenic and nutritionally induced changes in fetal metabolism in the horse. *Journal of Physiology*.
- Allen, M. J. (2003). Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(3), 101–113. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2003.tb00323.x>
- Amaral, L. A., Marchiori, M., Moraes, B. S., Finger, I., Santos, R. S. dos, & Nogueira, C. E. W. (2017). Relação entre adiposidade, perfil energético, proteínas inflamatórias e lesões osteoarticulares em equinos jovens sobre diferentes sistemas de criação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(2), 115–120. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000200004>
- Arner, E., Forrest, A. R. R., Ehrlund, A., Mejhert, N., Itoh, M., Kawaji, H., Lassmann, T., Laurencikienė, J., Rydén, M., & Arner, P. (2014). Ceruloplasmin Is a Novel Adipokine Which Is Overexpressed in Adipose Tissue of Obese Subjects and in Obesity-Associated Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(3), e80274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080274>
- Bazzano, M., Giannetto, C., Fazio, F., Arfuso, F., Giudice, E., & Piccione, G. (2014). Metabolic profile of broodmares during late pregnancy and early post-partum. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 49(6), 947–953. <https://doi.org/10.1111/rda.12411>
- Becht, J. L., & Park, R. D. (2000). *A Review of Selected Normal Radiographic Variations of the Equine Fetlock, Carpus, Tarsus and Stifle*.
- Belli, C. B., Fernandes, W. R., Torres, L. N., Sucupira, M. C. A., de Sá, L. R. M., Maiorka, P. C., Neuenschwander, H. M., de Barros, A. de M. C., & Baccarin, R. Y. A. (2021). Copper Toxicity in Horses: Does it Exist? *Journal of Equine Veterinary Science*, 106. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103752>
- Bruynsteen, L., Erkens, T., Peelman, L. J., Ducatelle, R., Janssens, G. P., Harris, P. A., & Hesta, M. (2013). Expression of inflammation-related genes is associated with adipose tissue

- location in horses. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 240. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-240>
- Burns, T. A., Geor, R. J., Mudge, M. C., McCutcheon, L. J., Hinchcliff, K. W., & Belknap, J. K. (2010). Proinflammatory Cytokine and Chemokine Gene Expression Profiles in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Depots of Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Light Breed Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(4), 932–939. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0551.x>
- Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R., & Burn, P. (1995). Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. *Science*, 269(5223), 546–549. <https://doi.org/10.1126/science.7624778>
- Canisso, I. F., Ball, B. A., Cray, C., Williams, N. M., Scoggin, K. E., Davolli, G. M., Squires, E. L., & Troedsson, M. H. (2014). Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72(4), 376–385. <https://doi.org/10.1111/aji.12278>
- Carolyn Cray, Julia Zaias, & Norman H Altman. (2009). *Assays of Acute Phase Proteins*.
- Carter, R. A., Geor, R. J., Burton Staniar, W., Cubitt, T. A., & Harris, P. A. (2009). Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Veterinary Journal*, 179(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.029>
- Cavinder, C. A., Vogelsang, M. M., Gibbs, P. G., Forrest, D. W., & Schmitz, D. G. (2007). Endocrine Profile Comparisons of Fat Versus Moderately Conditioned Mares Following Parturition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(2), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.12.004>
- Chavatte-Palmer, P., & Robles, M. (2019). *Developmental programming: Can nutrition of the mare influence the foal's health? Programação de desenvolvimento embrionário: A nutrição da égua pode influenciar a saúde do potro? October*. <https://www.researchgate.net/publication/336278296>
- Coleman, R. E. (2002). The clinical use of bone resorption markers in patients with malignant bone disease. *Cancer*, 94(10), 2521–2533. <https://doi.org/10.1002/cncr.10522>

- Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., & Garg, R. (2005). Metabolic Syndrome. *Circulation*, 111(11), 1448–1454. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000158483.13093.9D>
- Davies Morel, M. C. G., Newcombe, J. R., & Holland, S. J. (2002). Factors affecting gestation length in the Thoroughbred mare. *Animal Reproduction Science*, 74(3–4), 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00171-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00171-9)
- de Araújo, J. M., & de Oliveira, R. A. (2018). A influência da nutrição e a atuação da leptina e kisspeptina no ciclo reprodutivo da égua. In *Rev. Bras. Reprod. Anim* (Issue 1). www.cbpa.org.br
- Denko, C. W. (1979). Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents and Actions*, 9(4), 333–336. <https://doi.org/10.1007/BF01970657>
- Denoix, J. M., Jacquet, S., Lepeule, J., Crevier-Denoix, N., Valette, J. P., & Robert, C. (2013). Radiographic findings of juvenile osteochondral conditions detected in 392 foals using a field radiographic protocol. *Veterinary Journal*, 197(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.040>
- Desjardins, M. R., & Hurtig, M. B. (1990). Cartilage healing: A review with emphasis on the equine model. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 31(8), 565–572.
- Dobbs, T. N., Foote, C. E., Cawdell-Smith, A. J., Anderson, S. T., Boston, R. C., & Bryden, W. L. (2012). *Glucose and insulin dynamics in mares and their foals*.
- Doguer, C., Ha, J., & Collins, J. F. (2018). Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1433–1461). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170045>
- Dugdale, A. H. A., Curtis, G. C., Harris, P. A., & Argo, C. M. (2011). Assessment of body fat in the pony: Part I. Relationships between the anatomical distribution of adipose tissue, body composition and body condition. *Equine Veterinary Journal*, 43(5), 552–561. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00330.x>
- Eckersall, P. D., & Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. In *Veterinary Journal* (Vol. 185, Issue 1, pp. 23–27). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.009>

- Eisele, I., Wood, I. S., German, A. J., Hunter, L., & Trayhurn, P. (2005). Adipokine Gene Expression in Dog Adipose Tissues and Dog White Adipocytes Differentiated in Primary Culture. *Hormone and Metabolic Research*, 37(8), 474–481. <https://doi.org/10.1055/s-2005-870325>
- El-maaty, A. M. A., Mohamed, A. H., Abu-aita, N. A., & Morgan, H. M. (2017). Markers for Predicting Overweight or Obesity of Broodmares Journal of Equine Veterinary Science Markers for Predicting Overweight or Obesity of Broodmares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 56(December 2017), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.04.002>
- Fang, H., & Judd, R. L. (2018). Adiponectin regulation and function. *Comprehensive Physiology*, 8(3), 1031–1063. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170046>
- Fowden, A. L. (1997). Comparative aspects of fetal carbohydrate metabolism. In *Equine veterinary journal. Supplement* (Issue 24, pp. 19–25). <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb05074.x>
- Fowden, A. L., Barnes, R. J., Comline, R. S., & Silver, M. (n.d.). *PANCREATIC β -CELL FUNCTION IN THE FETAL FOAL AND MARE*.
- Fowden, A. L., Giussani, D. A., & Forhead, A. J. (2019). Physiological development of the equine fetus during late gestation. *Equine Veterinary Journal*, 165–173. <https://doi.org/10.1111/evj.13206>
- Fowden, A. L., Ralph, M. M., & Silver, M. (1994a). Nutritional regulation of uteroplacental prostaglandin production and metabolism in pregnant ewes and mares during late gestation. In *Exp Clin Endocrinol* (Vol. 102).
- Fowden, A. L., Ralph, M. M., & Silver, M. (1994b). Nutritional regulation of uteroplacental prostaglandin production and metabolism in pregnant ewes and mares during late gestation. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 102(03), 212–221. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211285>
- Freinkel N, Metzger BE, & Nitzan M. (1974). Facilitated anabolism in late pregnancy: some novel maternal compensations for accelerated starvation. *Proceedings of the VIIIth Congress of the International Diabetes Federation*.

- Fukao, T., Lopaschuk, G. D., & Mitchell, G. A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: On the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70(3), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.11.001>
- Gamucci, O., Lisi, S., Scabia, G., Marchi, M., Piaggi, P., Duranti, E., Viridis, A., Pinchera, A., Santini, F., & Maffei, M. (2012). Haptoglobin deficiency determines changes in adipocyte size and adipogenesis. *Adipocyte*, 1(3), 142–183. <https://doi.org/10.4161/adip.20041>
- Gastal, M. O., Gastal, E. L., Spinelli, V., & Ginther, O. J. (2004). *Relationships between body condition and follicle development in mares 1*. 115–121.
- Gentry, L. R., Thompson, D. L., Gentry, G. T., Del Vecchio, R. P., Davis, K. A., & Del Vecchio, P. M. (2004). The relationship between body condition score and ultrasonic fat measurements in mares of high versus low body condition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 24(5), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2004.04.009>
- George, L. A., Staniar, W. B., Cubitt, T. A., Treiber, K. H., Harris, P. A., & Geor, R. J. (2011). Evaluation of the effects of pregnancy on insulin sensitivity, insulin secretion, and glucose dynamics in Thoroughbred mares. *American Journal of Veterinary Research*, 72(5), 666–674. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.5.666>
- Girardi, F. M., da Fonseca, L. A., Ribeiro Filho, J. D., Souto, P. C., Ferreira, D. A. C., Dornelas, L. R. S. M., Bento, L. D., & de Carvalho Filho, W. P. (2019). Influence of Obesity on Serum Concentrations of Acute-Phase Proteins in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102810>
- Gonçalves, L. M., Pozzobon, R., dos Anjos, B. L., Pellegrini, D. C. P., Azevedo, M. S., Dau, S. L., Oliveira, G. P., & Klaus, R. (2019). Radiological evaluation of juvenile osteochondral conditions in Brazilian warmblood horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 102844. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102844>
- Grøndahl, A. M., & Engeland, A. (1995). Influence of radiographically detectable orthopedic changes on racing performance in standardbred trotters. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
- Healy, J., & Tipton, K. (2007). Ceruloplasmin and what it might do. *Journal of Neural Transmission*, 114(6), 777–781. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0687-7>

- Henneke, D. R., Potter, G. D., & Kreider, J. L. (1984). Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, 21(6), 897–909. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90383-2)
- HENNEKE, D. R., POTTER, G. D., KREIDER, J. L., & YEATES, B. F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 371–372. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>
- Henneke, D. R., Potter, G. D., Kreider, J. L., & Yeates, B. F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 371–372. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>
- Hines, K. K., Potter, G. D., & Harms, P. G. (1987). *RELATIONSHIP BETWEEN BODY CONDITION AND LEVELS OF SERUM LUTEINTZING*. 28(6), 815–825.
- Hultén, C., Tulamo, R.-M., Suominen, M. M., Burvall, K., Marhaug, G., & Forsberg, M. (1999). A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 68(2–4), 267–281. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00027-6)
- Inoue, Y., Matsui, A., Asai, Y., Aoki, F., Yoshimoto, K., Matsui, T., & Yano, H. (2008). Response of Biochemical Markers of Bone Metabolism to Exercise Intensity in Thoroughbred Horses. In *Equine Sci* (Vol. 19, Issue 4).
- Jacobsen, S., & Andersen, P. H. (2007). The acute phase protein serum amyloid a (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education*, 19(1), 38–46. <https://doi.org/10.2746/095777307X177235>
- Jain, S., Gautam, V., & Naseem, S. (2011). Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 118. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76489>
- Jellyman, J., Valenzuela, O., & Fowden, A. (2015). *Glucocorticoid programming of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and metabolic function: Animal studies from mouse to horse*.
- Jerry Kaneko, J., Harvey, J. J., & Bruss, M. L. (2008). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3>

- Kamr, A. M., Dembek, K. A., Gilsenan, W., Bozorgmanesh, R., Hassan, H. Y., Rosol, T. J., & Toribio, R. E. (2020). C-terminal telopeptide of type I collagen, osteocalcin, alkaline phosphatase, and parathyroid hormone in healthy and hospitalized foals. *Domestic Animal Endocrinology*, 72. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106470>
- Kane, A. J., Mcilwraith, ; C Wayne, Park, R. D., Rantanen, N. W., Morehead, J. P., & Bramlage, L. R. (2000). *The Effect of Radiograaphic Changes in Thoroughbred Yearlings on Future Racing Performance*.
- Kaneko, J. J. , H. J. W. , B. M. L. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3>
- Kearns, C. F., McKeever, K. H., Roegner, V., & al., et. (2006). Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. *Vet J*, 172, 460–465.
- Kim, O. Y., Shin, M. J., Moon, J., & Chung, J. H. (2011). Plasma ceruloplasmin as a biomarker for obesity: A proteomic approach. *Clinical Biochemistry*, 44(5–6), 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.01.014>
- Kubiak, J. R., Evans, J. W., Potter, G. D., Harms, P. G., & Jenkins, W. L. (1988). Parturition in the multiparous mare fed to obesity. *Journal of Equine Veterinary Science*, 8(2), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(88\)80035-2](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(88)80035-2)
- Lawrence, L., DiPietro, J., Ewert, K., Parrett, D., Moser, L., & Powell, D. (1992). CHANGES IN BODY WEIGHT AND CONDITION OF GESTATING MARES. *JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE*.
- Lazalde, B., Huerta-Guerrero, H. M., Simental-Mendía, L. E., Rodríguez-Morán, M., & Guerrero-Romero, F. (2014). Haptoglobin 2-2 Genotype Is Associated with TNF- α and IL-6 Levels in Subjects with Obesity. *Disease Markers*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/912756>
- Lecocq, M., Girard, C. A., Fogarty, U., Beauchamp, G., Richard, H., & Laverty, S. (2008). Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: Early events on the pathway to equine osteochondrosis? *Equine Veterinary Journal*, 40(5), 442–454. <https://doi.org/10.2746/042516408X297453>

- Lepage, O. M., Carstanjen, B., & Uebelhart, D. (2001). Non-Invasive Assessment of Equine Bone: An Update. *The Veterinary Journal*, 161(1), 10–23. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0541>
- Lepage, O. M., Hartmann, D. J., Eicher, R., Uebelhart, B., Tschudi, P., & Uebelhart, D. (1998). Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses. *Veterinary Journal*, 156(3), 169–175. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(98\)80120-2](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(98)80120-2)
- Lepeule, J., Bareille, N., Valette, J. P., Seegers, H., Jacquet, S., Denoix, J. M., & Robert, C. (2008). Developmental orthopaedic disease in limbs of foals: between-breed variations in the prevalence, location and severity at weaning. *Animal*, 2(2), 284–291. <https://doi.org/10.1017/S1751731107001024>
- Levy, A. P., Asleh, R., Blum, S., Levy, N. S., Miller-Lotan, R., Kalet-Litman, S., Anbinder, Y., Lache, O., Nakhoul, F. M., Asaf, R., Farbstein, D., Pollak, M., Soloveichik, Y. Z., Strauss, M., Alshiek, J., Livshits, A., Schwartz, A., Awad, H., Jad, K., & Goldenstein, H. (2010). Haptoglobin: Basic and Clinical Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(2), 293–304. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2793>
- Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R., & Lechler, R. I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394(6696), 897–901. <https://doi.org/10.1038/29795>
- Marchiori, M. O., Kasinger, S., Silva, K. R., Souza, L. S., Amaral, L. A., Nogueira, C. E. W., & Roll, V. F. B. (2015). Medidas comparativas do padrão morfométrico e perfil energético de éguas Crioulas no terço final da gestação, com diferentes escores corporais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67(3), 707–715. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7705>
- Morgan, J. W. (2013). *How to Take Radiographs of the Metacarpophalangeal/Metatarsophalangeal Joint ...In: Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP, 2013 - Nashville, TN, USA*. <http://www.ivis.org>
- Murata, H., Shimada, N., & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *Veterinary Journal*, 168(1), 28–40. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9)

- Nabi, G., Amin, M., Khan, A., & Kamil, M. (2014). Endogeneous Signals and Mammalian Puberty Onset: A Review. *Journal of Biology and Life Science*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.5296/jbls.v6i1.6032>
- Nathanielsz, P. W. (2006a). Animal Models That Elucidate Basic Principles of the Developmental Origins of Adult Diseases. *ILAR Journal*, 47(1), 73–82. <https://doi.org/10.1093/ilar.47.1.73>
- Nathanielsz, P. W. (2006b). *Animal Models That Elucidate Basic Principles of the Developmental Origins of Adult Diseases*.
- Orford, N., Cattigan, C., Brennan, S. L., Kotowicz, M., Pasco, J., & Cooper, D. J. (2014). The association between critical illness and changes in bone turnover in adults: a systematic review. *Osteoporosis International*, 25(10), 2335–2346. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2734-1>
- Ousey, J. C., Fowden, A. L., Wilsher, S., & Allen, W. R. (2008). The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foals. *Equine Veterinary Journal*, 40(7), 673–679. <https://doi.org/10.2746/042516408X322175>
- Panchal, M. T., Gujarati, M. L., & Kavani, F. S. (1995). Study of some of the reproductive traits of Kathi mares in Gujarat state. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 16(1), 47–49.
- Pazinato, F. M., Curcio, B. da R., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Wendt, C. G., Moreira, F., Schmit, R. A., & Nogueira, C. E. W. (2019). Immunolocalization of Leptin and its Receptor (ObR-b) in Equine Placenta at Term and Plasma Level Measurement in the Late Gestation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.03.008>
- Pereira De Melo, U., Silveira Palhares, M., Arabicano Gheller, V., Monteiro Da, J., Filho, S., Ferreira, C., Oliveira, F., & Leme, P. (2011). RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS À INANIÇÃO EM EQUINOS [Equine neuroendocrine responses to starvation]. In *Acta Veterinaria Brasilica* (Issue 1).
- Pereira, S. (2007). Efeito da desnutrição na resposta imune ao stress. *NUTRÍCIAS*.
- Platt, H. (1984). Growth of the equine foetus. In *Equine Veterinary Journal* (Vol. 16, Issue 4, pp. 247–252). <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1984.tb01920.x>
- Prestes, N. C., & Landim-Alvarenga, F. C. (2017). *Obstetrícia Veterinária, 2a edição*.

- Price, J. S. (1998). Biochemical markers of bone metabolism in horses: potentials and limitations? In *Veterinary journal (London, England : 1997)* (Vol. 156, Issue 3, pp. 163–165). W.B. Saunders. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(98\)80117-2](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(98)80117-2)
- PRICE, J. S., JACKSON, B., EASTELL, R., GOODSHIP, A. E., BLUMSOHN, A., WRIGHT, I., STONEHAM, S., LANYON, L. E., & RUSSELL, R. G. G. (1995). Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Equine Veterinary Journal*, 27(3), 201–207. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1995.tb03063.x>
- Puchkova, L. V., Babich, P. S., Zatulovskaia, Y. A., Ilyechova, E. Y., & Sole, F. Di. (2018). Copper metabolism of newborns is adapted to milk ceruloplasmin as a nutritive source of copper: Overview of the current data. In *Nutrients* (Vol. 10, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu10111591>
- R. G. Westervelt, J. R. Stouffer, H. F. H. and H. F. S. (1976). Estimating fatness in horses. *Proc. 10th Eq. Nutr. and Physiol. Symp.*, 4(4), 127–131.
- Ricci, R., & Bevilacqua, F. (2012). The potential role of leptin and adiponectin in obesity: A comparative review. *The Veterinary Journal*, 191(3), 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.04.009>
- Robles, M., Hammer, C., Staniar, B., & Chavatte-Palmer, P. (2021). Nutrition of Broodmares. In *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* (Vol. 37, Issue 1, pp. 177–205). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2021.01.001>
- Robles, M., Nouveau, E., Gautier, C., Mendoza, L., Dubois, C., Dahirel, M., Lagofun, B., Aubrière, M. C., Lejeune, J. P., Caudron, I., Guenon, I., Viguié, C., Wimel, L., Bouraima-Lelong, H., Serateyn, D., Couturier-Tarrade, A., & Chavatte-Palmer, P. (2018). Maternal obesity increases insulin resistance, low-grade inflammation and osteochondrosis lesions in foals and yearlings until 18 months of age. *PLoS ONE*, 13(1), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190309>
- Romero, C. E. M., & Zanesco, A. (2006). O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. In *Revista de Nutricao* (Vol. 19, Issue 1, pp. 85–91). Revista de Nutrição. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732006000100009>
- Rosa Neto, N. S., & Carvalho, J. F. de. (2009). O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 49(4), 413–430. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042009000400008>

- R.W. Quinn, A.O. Burk, J. K. S. and T. G. H. (2006). Equine Obesity: Implications for health and strategies for control. *4th MID-ATLANTIC NUTRITION CONFERENCE*.
- Santarém, C. (2004). *Valores séricos de macro e microminerais de eqüinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI), do nascimento aos seis meses de idade*. <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/252f70c8-434b-4e33-ae6f-29cc284f6d25/content>
- Santschi, E. M. (2013). *How to Interpret Radiographs of the Stifle Joint of the Young Performance Horse*. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP, 2013 - Nashville, TN, USA*. <http://www.ivis.org>
- Santschi, E. M. (2014). *How to Interpret Radiographs of the Carpus and Tarsus of the Young Performance...In: Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP, 2013 - Nashville, TN, USA*. <http://www.ivis.org>
- Saremi, B., Al-Dawood, A., Winand, S., Müller, U., Pappritz, J., von Soosten, D., Rehage, J., Dänicke, S., Häussler, S., Mielenz, M., & Sauerwein, H. (2012). Bovine haptoglobin as an adipokine: Serum concentrations and tissue expression in dairy cows receiving a conjugated linoleic acids supplement throughout lactation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146(3–4), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.03.011>
- Scarpace, P. J., & Zhang, Y. (2009). Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(3), R493–R500. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90669.2008>
- Schuler, G., Fürbass, R., & Klisch, K. (2018). Placental contribution to the endocrinology of gestation and parturition. *Animal Reproduction*, 15(Irrs), 822–842. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0015>
- Segovia, S. A., Vickers, M. H., Zhang, X. D., Gray, C., & Reynolds, C. M. (2015). Maternal supplementation with conjugated linoleic acid in the setting of diet-induced obesity normalises the inflammatory phenotype in mothers and reverses metabolic dysfunction and impaired insulin sensitivity in offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1448–1457. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.013>

- Sessions-Bresnahan, D. R., Heuberger, A. L., & Carnevale, E. M. (2018). Obesity in mares promotes uterine inflammation and alters embryo lipid fingerprints and homeostasis. *Biology of Reproduction*, 99(4), 761–772. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy107>
- Shetty, S., Kapoor, N., Bondu, J., Thomas, N., & Paul, T. (2016). Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20(6), 846. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.192914>
- Smith, G. D., Jackson, L. M., & Foster, D. L. (2002). Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology*, 57(1), 73–86. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00658-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00658-6)
- Stahl, L. T., Müller, A., Krohn, J., Büttner, K., & Wehrend, A. (2024). Article Serum concentrations of selenium, copper, and zinc in neonatal foals: Influence of failure of passive transfer and age-related changes. In *CVJ* (Vol. 65).
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 772–783. <https://doi.org/10.1038/nri1937>
- Torres, A. J., Nogueira, C. E. W., Mousquer, M. A., Jacobsen, T. K., Neves, A. P., & Bastiani, G. de. (2021). Prevalência de alterações radiológicas nas articulações do tarso em equinos com sobrepeso da raça crioula em manejo extensivo. *Research, Society and Development*, 10(8), e35610817185. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17185>
- Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiological Reviews*, 93(1), 1–21. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012>
- van de Sande-Lee, S., & Velloso, L. A. (2012). Disfunção hipotalâmica na obesidade. In *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* (Vol. 56, Issue 6, pp. 341–350). <https://doi.org/10.1590/S0004-27302012000600001>
- van Weyenberg, S., Buyse, J., Kalmar, I. D., Swennen, Q., & Janssens, G. P. J. (2013). Voluntary feed intake and leptin sensitivity in *ad libitum* fed obese ponies following a period of restricted feeding: a pilot study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(4), 624–631. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01300.x>

- Vargas, D. M., Audí, L., & Carrascosa, A. (1997). Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 43(4), 367–370. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000400016>
- Vick, M. M., Adams, A. A., Murphy, B. A., Sessions, D. R., Horohov, D. W., Cook, R. F., Shelton, B. J., & Fitzgerald, B. P. (2007). Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of Animal Science*, 85(5), 1144–1155. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-673>
- Vick, M. M., Murphy, B. A., Sessions, D. R., Reedy, S. E., Kennedy, E. L., Horohov, D. W., Cook, R. F., & Fitzgerald, B. P. (2008). Effects of systemic inflammation on insulin sensitivity in horses and inflammatory cytokine expression in adipose tissue. *American Journal of Veterinary Research*, 69(1), 130–139. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.1.130>
- Ytrehus, B., Carlson, C. S., & Ekman, S. (2007). Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. In *Veterinary Pathology* (Vol. 44, Issue 4, pp. 429–448). <https://doi.org/10.1354/vp.44-4-429>
- Zanatta, L. C. B., Boguszewski, C. L., Borba, V. Z. C., & Kulak, C. A. M. (2014). Osteocalcina, metabolismo energético e da glicose. In *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* (Vol. 58, Issue 5, pp. 444–451). Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. <https://doi.org/10.1590/0004-2730000003333>
- Zhang, Z., Tang, H., Du, T., & Yang, D. (2024). The impact of copper on bone metabolism. In *Journal of Orthopaedic Translation* (Vol. 47, pp. 125–131). Elsevier (Singapore) Pte Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2024.06.011>

27. ANEXOS

TABELA 1 Descrição da escala de condição corporal de Henneke et al. (1983).

Escore	Descrição
1 (emaciado)	Animal extremamente emaciado. Processos espinhosos, costelas, inserção da cauda, estruturas da garupa e projeção do ísquio proeminentes. Estruturas ósseas da cernelha, ombros e pescoço facilmente visíveis. O tecido adiposo não é palpável.
2 (muito magro)	Animal emaciado. Fina camada de gordura cobrindo a base dos processos espinhosos, processos transversos das vértebras lombares arredondadas. Processos espinhosos, costelas, inserção da cauda, estruturas da garupa e projeção do ísquio proeminentes. Estruturas ósseas da cernelha, ombros, e pescoço facilmente observadas.
3 (magro)	Gordura cobrindo cerca de metade dos processos espinhosos, processos transversos não são palpáveis. Inserção da cauda proeminente, porém as vértebras não são mais observadas individualmente. Estruturas da garupa arredondadas, entretanto, facilmente observadas. Projeção do ísquio não visível. Costelas, ombros e pescoço acentuados.
4 (moderadamente magro)	Sulco ao longo da região lombar. Linha das costelas visível. Gordura pode ser palpada na inserção da cauda de acordo com a conformação do animal. Estruturas da garupa não são visíveis. Costelas, ombros e pescoço não são facilmente visíveis.
5 (moderado)	Costelas não são observadas, porém, facilmente palpáveis. Gordura na região da inserção da cauda começa a se tornar esponjosa. Cernelha arredondada sobre os processos espinhosos. Ombros e pescoço ligados suavemente ao corpo do animal.
6 (moderadamente gordo)	Pode haver pequena depressão na linha dorsal. Gordura sobre as costelas se torna esponjosa. Gordura na região da inserção da cauda se torna macia. Gordura começa a ser depositada ao longo da cernelha, atrás dos ombros e ao longo do pescoço.

7 (gordo)	Pode haver uma depressão na linha dorsal. Costelas podem ser individualmente palpáveis, porém, é possível sentir gordura entre elas. Gordura na região da inserção da cauda se torna e é macia. Gordura depositada ao longo da cernelha, atrás dos ombros e ao longo do pescoço.
8 (obeso)	Depressão na linha dorsal. Dificuldade para palpar as costelas. Gordura na região da inserção da cauda é muito macia. Região próxima a cernelha preenchida com gordura. Visível aumento na espessura do pescoço. Gordura depositada nas nádegas..
9 (muito obeso)	Acentuada depressão na linha dorsal. Gordura macia sobre as costelas. Dobras de gordura na região de inserção da cauda, ao longo da cernelha, atrás dos ombros e ao longo do pescoço. Gordura ao longo da parte interna das coxas. Flanco preenchido com gordura.