

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**CAMBIOS HORMONALES ASOCIADOS A ETAPA GESTACIONAL Y
OBESIDAD EN YEGUAS CRIOLLAS**

por

ROTELA ESPONDA, Franco

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

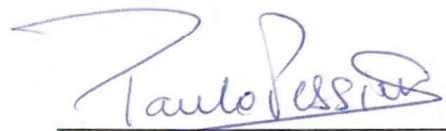
MODALIDAD: Trabajo de investigación

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2022**

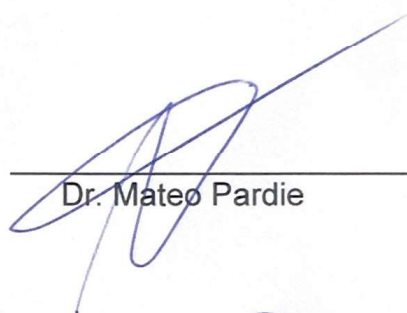
1. PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

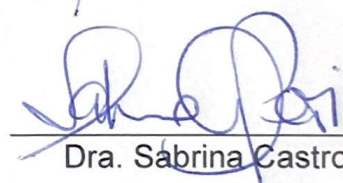
Presidente de mesa:


Dra. Paula Pessina

Segundo miembro (Tutor):


Dr. Mateo Pardie

Tercer miembro:


Dra. Sabrina Castro

Fecha:

15/08/2022

Autor:


Franco Rotela Esponda

2. AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amistades (difícil separarlos a esta altura), motores fundamentales en el camino recorrido y en lo que sea que se venga. Por su apoyo constante e incondicional, sabiendo entender distancias y numerosas ausencias. No logro imaginarme llegando hasta acá sin su respaldo.

Una mención con especial cariño a quienes no llegaron a ver concretada esta etapa. Al “ejemplo del barrio”, ¡cómo serán los otros!

A mis tutores, por su paciencia y dedicación; espero que sigamos teniendo instancias de discusión tan enriquecedoras como las que tuvimos en la realización de este trabajo.

A los integrantes de la Unidad de Clínica y Cirugía de Equinos, en quienes encontré grandes compañeros en este último año.

A las funcionarias de biblioteca por su ayuda en la corrección de bibliografía.

3. TABLA DE CONTENIDO

1. PÁGINA DE APROBACIÓN	2
2. AGRADECIMIENTOS.....	3
3. TABLA DE CONTENIDO	4
4. LISTA DE FIGURAS	5
5. RESUMEN	6
6. SUMMARY	7
7. INTRODUCCIÓN.....	8
8. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
Control de la glicemia	9
Sensibilidad a la insulina	10
Tejido adiposo y adipoquinas	11
Obesidad.....	13
Síndrome metabólico equino (SME).....	13
Gestación.....	14
9. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA.....	14
10. HIPÓTESIS	15
11. OBJETIVOS	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos	15
12. MATERIALES Y MÉTODOS	15
Animales	15
Hematología y bioquímica sérica.....	16
Determinación hormonal	16
Determinación de proxies	17
Análisis estadístico.....	17
13. RESULTADOS.....	17
14. DISCUSIÓN.....	21
15. CONCLUSIONES.....	23
16. BIBLIOGRAFÍA.....	24

4. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a- Condición corporal, b- Leptina (ng/mL), c- Adiponectina (ng/mL); en yeguas normopesas y obesas durante la gestación.....	18
Figura 2. a- Glicemia (mg/dL), b- Insulina (μ UI/mL), c- Índice HOMA; en yeguas normopesas y obesas durante la gestación.	20

5. RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue describir cambios hormonales durante la gestación y su asociación con la condición corporal (CC), en yeguas criollas. Para esto se estudiaron 25 animales, divididos en dos categorías en función de su CC: normopesas ($CC < 7$) ($n=14$) y obesas ($CC > 7$) ($n=11$). En los mismos se determinó leptina, adiponectina, glucosa e insulina basales e índice HOMA; en tres momentos gestacionales: entre 3 y 5 meses de gestación (PerGest 1), entre 8 y 9 meses (PerGest 2) y en el último mes de gestación (PerGest 3). La condición corporal afectó la leptinemia y la glicemia, siendo mayor en yeguas obesas. El período gestacional afectó a la condición corporal, la glicemia, la insulinemia y el índice HOMA ya que todas estas variables aumentaron hacia el final de la gestación. La interacción entre condición corporal y período gestacional afectó la glicemia y tendió a afectar el índice HOMA, ya que en yeguas normopesas estas variables aumentaron de forma marcada durante la gestación, mientras que en yeguas obesas estos indicadores fueron altos y permanecieron altos durante la gestación. Concluimos que existen alteraciones en el metabolismo de los glúcidos y en la concentración de adipoquinas durante la gestación que se asocian a la condición corporal.

6. SUMMARY

The aim of this thesis was to describe hormonal changes during gestation and its association with body condition in criollo mares. Mares (n=25) were classified according to body condition score (BCS) into: normal (BC<7) (n=14) and obese (BC>7) (n=11). Leptin, adiponectin, basal glucose and insulin, and Homa index were determined for both groups, in three gestational periods: between 3rd and 5th month of gestation (PerGest 1), between 8th and 9th month of gestation (PerGest 2) and in the last month of gestation (PerGest 3). Leptin and glucose concentrations were affected by the BCS, as they were greater in obese mares. Glucose, insulin, HOMA index, and BCS were affected by the gestational period as their increased towards the end of gestation. The interaction between body condition and gestational period affected glycemia and tended to affect HOMA index, as in normal mares they increased towards the end of gestation and in obese mares, they were high at the initiation of the experiment and they were maintained during gestation. We concluded that alterations in glucidic metabolism and adipokine concentrations during gestation are associated with the BCS.

7. INTRODUCCIÓN

Durante la gestación, la regulación hormonal del metabolismo se ve sometida a una adaptación fisiológica que maximiza el uso eficiente de los nutrientes, para el mutuo beneficio de la madre y el desarrollo fetal. La madre debe suplir sus requerimientos metabólicos y los del feto en desarrollo (Fowden, Comline & Silver, 1984). El combustible de preferencia para el feto equino es la glucosa, la disminución en su disponibilidad afecta al desarrollo del mismo (Fowden, Giussani & Forhead, 2020). La regulación de la glucosa está dada por un complejo balance de factores hipo e hiperglucemiantes (Ralston, 2002).

Hacia los 270 días de gestación existe una sensibilidad aumentada a la glucosa en las células pancreáticas que resulta en hiperinsulinemia, lo que facilita que madre y feto cubran los requerimientos de glucosa (Fowden et al., 1984). En los últimos meses de gestación, el feto gana el 45% de su peso vivo y tiene una muy alta demanda de glucosa, por lo que el útero remueve el 75% de la glucosa disponible de la circulación materna (Evans, 1971; Silver & Fowden, 1982). De forma fisiológica, se genera una resistencia a la insulina al final de la gestación de la yegua, priorizando el traspaso de glucosa de la madre al feto. Si bien existe una gran variación individual, se ha reportado que la sensibilidad a la insulina disminuye durante la gestación media y tardía (Morresey, 2012). Robles et al. (2018) reportan que esta característica se ve exacerbada en yeguas obesas preñadas, mientras que otros autores no encontraron asociación entre niveles de insulina y condición corporal en yeguas gestantes (Smith, Marr, Dunnett & Menzies-Gow, 2017).

El tejido adiposo es un potente tejido endócrino, secretor de adipoquinas; entre ellas leptina y adiponectina, que influyen en el metabolismo de los carbohidratos (Selim et al., 2015). Se ha demostrado que la obesidad se asocia con aumentos de leptina plasmática y disminución de adiponectina en varias especies (Meikle et al., 2018; Meier, de Laat, Reiche & Sillence, 2020). Aumentos en la concentración plasmática de leptina fueron asociados a hiperinsulinemia en equinos (Morgan, McGowan & McGowan, 2014). La adiponectina es conocida por sus funciones protectoras en el organismo al sensibilizar los tejidos a la insulina y por su efecto antiinflamatorio (Whitehead, Richards, Hickman, Macdonald & Prins, 2006; Hopkins, Ouchi, Shibata & Walsh, 2007; Wooldridge et al., 2012).

El síndrome metabólico equino agrupa un conjunto de factores de riesgo conocidos por desencadenar laminitis de origen endócrino. Entre ellos se describe a la obesidad, dislipidemia y especialmente la desregulación de la insulina (DI) como factores claves del mismo (Durham et al., 2019). En equinos particularmente, la DI suele ser compensada, es decir, una disminución de la sensibilidad tisular a dicha hormona que provoca un aumento en la secreción de insulina pancreática, resultando en hiperinsulinemia y niveles de glicemia dentro del rango normal (Morgan, Keen & McGowan, 2015). Recientemente nuestro grupo, en Uruguay (Pardié, Carzoli & Meikle, 2021), ha reportado el primer caso de laminitis asociado a dismetabolias.

En nuestro país la investigación de la regulación endocrina del metabolismo, más específicamente la DI en yeguas durante la gestación es inexistente. Se considera de relevancia iniciar una línea de trabajo en este tema, por la influencia de la DI, factor clave del Síndrome Metabólico, en los cuadros de laminitis (Geor, 2008). Si tenemos en cuenta que el principal factor de riesgo para el desarrollo de este síndrome es la obesidad, aquellos equinos con tendencia a depositar grasa más fácilmente (“easy keepers”) están claramente predispuestos. En este sentido, está establecido que la raza criolla tiene una alta prevalencia de obesidad y consecuente Síndrome Metabólico, ya que evolutivamente tuvo que adaptarse a sobrevivir en climas adversos (Cantarelli et al., 2018). Y más aún si consideramos que las alteraciones endócrinas preexistentes se verán exacerbadas durante la gestación (Morrese, 2012).

8. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Control de la glicemia

La glicemia está finamente regulada por un complejo balance entre hormonas hiper e hipoglucemiantes (Ralston, 2002).

En el equino, los niveles basales de glucosa sanguínea se mantienen entre 72 y 117 mg/dL (Nadal, Thompson Jr & Kincaid, 1997; Williams, Kronfeld, Stanier & Harris, 2001) y, en general, estas concentraciones varían poco, ya sea en condiciones de ayuno, ejercicio o al suministrarse diversos alimentos (Lawrence, Williams, Soderholm, Roberts & Hintz, 1995; Nadal et al., 1997). Sí se observan cambios drásticos cuando el ejercicio es intenso, en cuadros de enfermedad sistémica, condiciones de estrés o alimentación con alto contenido en azúcares; pero los niveles normales de glicemia se restablecen rápidamente una vez superado el episodio (Bertin & Fraser, 2020).

La disminución de la glicemia desencadena un aumento en la secreción de glucagón por parte de las células alfa del páncreas (Fields, 1998). Este promueve la neoglucogénesis, la glucogenólisis y lipólisis (Habegger et al., 2010).

Por otra parte, un aumento en la glicemia provoca la secreción de insulina. Se trata de una hormona peptídica compuesta por 51 aminoácidos, producida y liberada por las células beta pancreáticas (Yaribeygi, Farrokhi, Butler & Sahebkar, 2019; Bertin & Fraser, 2020). Es el resultado de clivajes sucesivos; de preproinsulina pasa a proinsulina, a partir de esta última se genera la insulina como tal y el péptido-C (Bertin & Fraser, 2020). Si bien el principal estímulo para su secreción es la hiperglicemia, también se ve inducida por un aumento en los aminoácidos circulantes; el incremento de secretagogos insulínicos o incretinas, producidas por el tracto digestivo; y el descenso en la concentración de glucagón (Holz IV, Kihlreiber & Habener, 1993; Bamford, Baskerville, Harris & Bailey, 2015; Chameroy, Frank, Elliott & Boston, 2016; de Laat, McGree & Sillence, 2016). Su secreción presenta un patrón bifásico, con un primer pico alrededor de los 10 minutos después de una hiperglicemia, y uno más tardío y duradero

aproximadamente 2 horas después (Lorenzo et al., 2010); gran parte de lo secretado es eliminado por el hígado.

Presenta una amplia gama de respuestas biológicas, incluyendo estimular la utilización de glucosa por parte de las células, la síntesis de glucógeno y lipogénesis, disminuir la lipólisis, facilitar la síntesis de ADN y la replicación celular (Wylie & Collins, 2010; Bertin & Fraser, 2020). Los principales blancos de esta hormona son los miocitos, adipocitos y hepatocitos. Al unirse a su receptor, en los dos primeros, desencadena una cascada enzimática intracelular que resulta en la traslocación de transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT 4) preformados, a la membrana celular (Lacombe, 2014; Bertin & Fraser, 2020). Luego de ejercer su acción es eliminada por endocitosis o depurada por hígado y riñones (Duckworth, Bennett & Hamel, 1998; Yaribeygi et al., 2019).

Sensibilidad a la insulina

La sensibilidad a la insulina se define como la capacidad de dicha hormona de promover la utilización de glucosa e inhibir la producción de esta de forma endógena (Kinsella et al., 2022). Por el contrario, la insulino resistencia (IR) es la falla de los tejidos, normalmente sensibles a la misma, de responder de forma adecuada; siendo el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado, los que se afectan de forma primaria. Esta alteración puede deberse a una afectación en cualquier nivel; ya sea un defecto en la interacción insulina- receptor, un problema en la cascada enzimática intracelular o una disfunción en los GLUT 4; siendo esta última la causa más probable en el equino (Lebovitz, 2001; Waller, Burns, Mudge, Belknap & Lacombe, 2011; Waller, Kohler et al., 2011). Como consecuencia se tiene una captación inadecuada de glucosa en los tejidos insulino dependientes, aumento en la síntesis hepática de glucosa y aumento en la lipólisis, lo que resulta en un incremento de ácidos grasos libres circulantes (Frank & Tadros, 2014). En el equino, a diferencia de otras especies, la IR no se manifiesta con una hiperglicemia o exceso de productos glicosilados (Frank, Elliott, Brandt & Keisler, 2006; de Laat, Kyaw-Tanner, Sillence, McGowan & Pollitt, 2012); a su vez, no siempre se detecta una hiperinsulinemia, ya sea de forma basal o post prandial (Dunbar, Mielnicki, Dembek, Toribio & Burns, 2016; Bertin & de Laat, 2017).

La IR se encuentra contemplada dentro de lo que se denomina de forma genérica como desregulación de la insulina (DI), término que describe un disturbio en la relación de concentraciones plasmáticas de insulina, glucosa y lípidos. Puede manifestarse de diversas maneras, como ser: hiperinsulinemia basal; hiperinsulinemia excesiva o prolongada frente a un desafío con carbohidratos y resistencia tisular a la insulina (Durham et al. 2019). La DI está fuertemente vinculada con patologías endócrinas, pero también a eventos fisiológicos como el estrés o la gestación (Fowden et al., 1984; Mills, Ng, Kramer & Auer, 1997; McGowan, Frost, Pfeiffer & Neiger, 2004; Tóth, Frank, Elliott, Geor & Boston, 2008; de Laat, McGowan, Sillence, & Pollitt, 2010; Frank, Geor, Bailey, Durham & Johnson, 2010; Bertin, Ruffin-Taylor & Stewart, 2018; Durham et al., 2019). A su vez se han reportado diferencias raciales en cuanto a sensibilidad a la insulina (Bamford, Potter, Harris & Bailey, 2014); mientras que el sexo no parece ser un

factor influyente (Buff et al., 2002; Cartmill, Thompson Jr, Del Vecchio, Storer & Crowley, 2006; Wray, Elliott, Bailey, Harris & Menzies-Gow, 2013; Hart et al., 2016).

Existen diversas maneras de determinar las mencionadas alteraciones insulínicas, como por ejemplo la utilización de proxies, es decir cálculos matemáticos realizados a partir de concentraciones de glucosa y/o insulina en ayuno, desarrollados para determinar sensibilidad a la insulina y respuesta de las células beta. Son determinaciones baratas, fáciles de obtener y apropiadas tanto para grandes estudios epidemiológicos como para ensayos clínicos (Muniyappa, Lee, Chen & Quon, 2008). Entre ellos, el llamado modelo de evaluación de homeostasis (HOMA), en sus distintas variantes, determina las interacciones entre la insulina y la glucosa (Muniyappa et al., 2008).

Tejido adiposo y adipocinas

El tejido adiposo es un órgano difuso compuesto por adipocitos, preadipocitos, células mesenquimales multipotentes, células endoteliales, pericitos, monocitos, macrófagos y células nerviosas. Además de la conocida función de depósito de energía, es considerado un órgano endócrino complejo, secretor de factores que regulan el metabolismo energético y función inmunitaria, entre otros (Radin, Sharkey & Holycross, 2009).

La expresión génica de dichos factores en los depósitos grasos es variable según su localización, viéndose alterada por influencias locales. Entre las sustancias que produce se encuentran hormonas esteroideas, factores de crecimiento, citoquinas, eicosanoides, proteínas de complemento, proteínas de unión, factores vasoactivos y reguladores del metabolismo lipídico (Sethi & Vidal-Puig, 2007). De forma genérica estos factores se denominan adipocinas, y se trata de elementos biológicamente activos, que ejercen funciones autócrinas, parácrinas o endócrinas (Pan & Kastin, 2007). Su producción puede verse influenciada por las hormonas sexuales y el estatus nutricional (Trujillo & Scherer, 2006). Hay evidencias de que contribuyen en la regulación de diversos procesos biológicos, como ser la inflamación y la respuesta inmune (Lago, Dieguez, Gómez-Reino & Gualillo, 2007; Schäffler, Schölmerich & Salzberger, 2007).

Entre las mencionadas sustancias, la mejor caracterizada en las especies domésticas es la leptina (Radin et al., 2009). Se trata de una proteína producida, principalmente, por los adipocitos. Los niveles séricos de leptina están definidos principalmente por la grasa corporal, aunque presenta oscilaciones; un aumento transitorio post prandial y disminución en ayuno (Radin et al., 2009). Además, su transcripción está influenciada por diversos mediadores inflamatorios y metabólicos, como los glucocorticoides, factor de necrosis tumoral alfa, interleucinas 1 y 6, estrógenos y testosterona. Las primeras funciones descritas para esta hormona son la supresión del apetito y el aumento del gasto energético (Houseknecht & Portocarrero, 1998; Heshka & Jones, 2001); además se asocia con la regulación del peso y el mantenimiento de la homeostasis del organismo, teniendo un papel importante en la modulación de la reproducción, inmunidad y,

particularmente, en la sensibilidad a la insulina; de hecho se reportan alteraciones como hiperinsulinemia o respuestas exageradas a la administración de glucosa, en animales hiperleptinémicos (Cartmill, Thompson, Storer, Gentry & Huff, 2003; Radin et al., 2009; Arfuso, Giannetto, Bazzano, Assenza & Piccione, 2021); adicionalmente se la considera un factor de crecimiento, por su capacidad de promover la angiogénesis, inhibir la apoptosis y actuar como mitógeno (Garofalo & Surmacz, 2006). En general se la puede caracterizar como proinflamatoria, protrombótica y prooxidante (Katagiri, Yamada & Oka, 2007).

En el equino la grasa corporal es el principal determinante de los niveles de leptina (Fitzgerald & McManus, 2000; Buff et al., 2002; Gentry et al., 2002; Kearns, McKeever, Roegner, Brady & Malinowski, 2006), sin embargo no todos los individuos obesos presentan hiperleptinemia (Gentry et al., 2002; Van Weyenberg, Buyse, Kalmar, Swennen & Janssens, 2013), además se ha detectado esta hormona y su receptor en otros tejidos, como la placenta (Pazinato et al., 2019). Cartmill et al. (2003) reportaron que equinos con hiperleptinemia presentaron hiperglicemia, hiperinsulinemia y respuesta de insulina y glucosa exagerada a la administración de dexametasona. Se ha reportado que hembras con bajas concentraciones de leptina entran en anestro estacional, mientras que aquellas con mayor condición corporal y niveles más altos de leptina ciclan todo el año (Fitzgerald & McManus, 2000; Gentry et al., 2002).

Otro producto de la secreción del tejido adiposo es la adiponectina. Es una adipoquina de mucho interés por ser sensibilizante a la insulina, y presentar efectos antiinflamatorios y antiescleróticos en diversas especies (Whitehead et al., 2006; Hopkins et al., 2007; Wooldridge et al., 2012). Los genes de esta hormona son de los que más se expresan en el tejido adiposo. En la mayoría de las especies, la adiponectina circulante se compone por tres órdenes: trímeros, hexámeros de bajo peso molecular (BPM), y multímeros de alto peso molecular (APM); siendo estos últimos los que presentan mayor actividad biológica (Schraw, Wang, Halberg, Hawkins & Scherer, 2008; Radin et al., 2009). Las hembras tienen adiponectina total circulante más elevada que los machos (Arita et al., 1999; Ebinuma et al., 2006), esto se debe a que presentan mayor proporción de fracción APM (Pajvani et al., 2003; Peake, Kriketos, Campbell, Shen & Charlesworth, 2005; Ebinuma et al., 2006). La testosterona está implicada en esta diferencia, al disminuir la secreción de dicha fracción (Xu et al., 2005).

Es un importante regulador del metabolismo. Sus efectos se relacionan con la expresión de receptores tejido-específicos, y por la diferencia en la afinidad de las distintas formas moleculares a dichos receptores. En hígado y músculo aumenta la sensibilidad a la insulina, disminuyendo la glucosa sanguínea; y aumenta la β - oxidación, disminuyendo el contenido tisular de triglicéridos. Se reconocen dos tipos de receptores: AdipoR1, AdipoR2, presentes en diversos tejidos, incluido el aparato reproductor de la hembra. (Radin et. al, 2009; Pearson, 2015).

En el equino, presenta una correlación negativa con el contenido de grasa del organismo y condición corporal (Kearns et al., 2006; Gordon, McKeever, Betros & Manso Filho, 2007); en individuos obesos se correlaciona negativamente con las concentraciones de insulina (Wooldridge et al., 2012); más específicamente,

se ha visto esta misma relación entre la fracción de alto peso molecular y condición corporal, inflamación y concentración de insulina sérica (Pearson, 2015). También se observa una correlación negativa con los niveles de leptina (Kearns et al., 2006; Gordon et al., 2007). Asociado a las características mencionadas, se reporta que se encontró disminuida en ponis con historial de laminitis (Wray et al., 2013).

Obesidad

La obesidad en el equino implica la presencia de uno o más depósitos grasos localizados o generalizados, predisposición a ganar peso o la dificultad para perderlo (Durham et al., 2019). Para considerar un equino como obeso, en general se acepta que su score de condición corporal sea mayor a 7, de un total de 9 (Henneke, Potter, Kreider & Yeates, 1983). La presencia de obesidad en un individuo probablemente se deba a una serie de interacciones de factores ambientales y genéticos (Radin et al., 2009).

Una posible consecuencia de los excesos en depósitos grasos es la desregulación en la producción de adipoquinas y mediadores inflamatorios; lo que repercute en el control de la glicemia y en la inflamación (Radin et al., 2009). Se ha visto que en algunos equinos obesos las concentraciones de leptina están por encima de lo esperado (Kearns et al., 2006; Van Weyenberg et al., 2013). Se ha observado una correlación positiva entre hiperleptinemia e hiperinsulinemia en ponies (Morgan et al., 2014). La concentración de adiponectina, por el contrario, se correlaciona inversamente con la grasa corporal y la insulino resistencia (Kearns et al., 2006).

Una serie de alteraciones pueden vincularse con la obesidad, pero la que más relevancia presenta es la desregulación de la insulina (DI), por su incidencia en la aparición de laminitis de origen endócrino (Carter, Treiber, Geor, Douglass & Harris, 2009; Durham et al., 2019).

Síndrome metabólico equino (SME)

Definido como un conjunto de factores de riesgo para el desarrollo de laminitis de origen endócrino (Durham et al., 2019), su principal característica es la desregulación de la insulina (Frank & Tadros, 2014). Si bien la adiposidad no es determinante para la ocurrencia del SME, sí puede contribuir acentuando las alteraciones insulínicas (McCue, Geor & Schultz, 2015; Selim et al., 2015). La DI juega un papel clave en el SME, ya que genera hiperinsulinemia (de Laat et al., 2016), lo que a su vez es determinante para la aparición de laminitis (Asplin, Sillence, Pollitt & McGowan, 2007; de Laat et al., 2010; de Laat, Sillence, McGowan & Pollitt, 2012).

Se han descrito diferencias raciales en susceptibilidad al SME (Durham et al., 2019) y altos niveles de heredabilidad para diversos rasgos asociados al mismo (Norton et al., 2019).

Los equinos que padecen este síndrome, con frecuencia se consideran “easy keepers” (Lewis et al., 2017), lo que hace referencia a la tendencia al desarrollo de obesidad; rasgo que caracteriza a diversas razas, incluida la criolla (Cantarelli et al., 2018). Potencialmente, pruebas genéticas podrían ayudar a identificar individuos con riesgo de padecer SME (Knowles & Grieve, 2020), de hecho se ha determinado un factor genético asociado al riesgo de desarrollo del mismo en caballos árabes (Lewis et al., 2017).

Gestación

La gestación en humanos y otras especies animales se caracteriza por cambios en el metabolismo que tienen como finalidad cubrir los requerimientos energéticos fetoplacentarios (Butte, 2000). Mientras que la utilización materna de la glucosa es controlada por la insulina, la utilización de dicho nutriente por el feto depende únicamente del gradiente de concentración a través de la placenta (Simmons, Battaglia & Meschia, 1979). Durante la gestación la madre debe suplir sus requerimientos y los del feto en desarrollo. En la yegua, se reportan cambios notorios en el metabolismo de los carbohidratos y funcionalidad de las células beta pancreáticas, pudiendo observarse hiperinsulinemia y sensibilidad de células beta exacerbada frente a glucosa endógena o exógena (Fowden et al., 1984). A medida que la gestación avanza, los requerimientos fetales aumentan (Van Assche, Hoet & Jack, 1984) y se ven cubiertos redireccionando los nutrientes hacia el feto, en detrimento del aporte hacia los tejidos maternos (Evans, 1971). A partir del día 270 de gestación, el feto gana el 45% de su peso de nacimiento y tiene una alta captación de glucosa (Meyer & Ahlswede, 1978 citado por Fowden et al., 1984). En esta etapa el 75% de la glucosa es retenida por el útero (Evans, 1971; Silver & Fowden 1982), hay menores niveles de insulina, sensibilidad de células beta disminuida y menor eficiencia de insulina exógena para controlar la glicemia. Lo que indica que, en la preñez tardía, los requerimientos fetales se cubren reduciendo la utilización materna de glucosa al mínimo (Fowden et al., 1984).

En yeguas con SME cualquier alteración endócrina vinculada a la gestación, probablemente se verá exacerbada (Morresey, 2012).

Robles et al. (2018) reportaron una disminución en glucosa y un aumento en insulina plasmáticas durante la gestación. Concluyeron que yeguas obesas presentan mayor insulino resistencia en la preñez tardía; y mayores niveles de leptina y menores de adiponectina durante toda la gestación. Observaron también que las yeguas normopesas perdieron puntos de condición corporal desde el día 180 de gestación hasta el parto, y tuvieron un incremento en los niveles de adiponectina. Smith et al. (2017) no encontraron asociación entre gestación y obesidad con los niveles de insulina.

9. CARACTERIZACION DEL PROBLEMA

La gestación se acompaña con cambios metabólicos importantes debido a las necesidades del feto, especialmente de glucosa. Se ha descrito una sensibilidad

aumentada a la glucosa e hiperinsulinemia; y un posterior desarrollo de resistencia a la insulina y pérdida de sensibilidad a la glucosa fisiológicas en yeguas sanas preñadas, lo que permite redirigir los nutrientes hacia el feto que se está desarrollando (Fowden et al., 1984; Morresey, 2012).

A su vez, el control de la glicemia también puede verse afectado por la obesidad mediante la alteración en los niveles circulantes de adipoquinas, principalmente leptina y adiponectina (Durham et al., 2019). Hay algunos reportes respecto al impacto de la obesidad en el metabolismo glucídico, durante la gestación. Robles et al., 2018 concluyen que yeguas obesas son más insulino resistentes hacia el final de la gestación y que presentan mayores niveles de leptina y menores de adiponectina; Smith et al. (2017) no hallaron asociación entre obesidad y gestación con insulinemia. En nuestro país la investigación de dismetabolias en el equino son prácticamente inexistentes. No hemos encontrado estudios sobre las concentraciones de insulina y glucosa durante la gestación acorde a la condición corporal en equinos, a nivel nacional.

Está establecido que la raza criolla tiene una alta prevalencia de obesidad y consecuente Síndrome Metabólico, ya que evolutivamente tuvo que adaptarse a sobrevivir en climas adversos (Cantarelli et al., 2018). Esto es especialmente importante si tenemos en cuenta que el principal factor de riesgo para el desarrollo de SME es la obesidad; y aquellos equinos con tendencia a depositar grasa más fácilmente (“easy keepers”) están claramente predispuestos.

10. HIPÓTESIS

Los niveles de leptina, adiponectina, insulina y glucosa, así como el índice HOMA se ven afectados de forma diferencial por la condición corporal durante la gestación en yeguas criollas.

11. OBJETIVOS

Objetivo general

Describir cambios hormonales y del metabolismo glucídico, durante la gestación y su asociación con la condición corporal, en yeguas criollas.

Objetivos específicos

Determinar la concentración de leptina, adiponectina, insulina, glucosa e índice HOMA, en yeguas criollas con distintos grados de condición corporal en tres momentos de la gestación.

12. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

El protocolo fue aprobado por la CEUA (CEUAFVET-1184 111900-000951-20). Para el estudio se incluyeron 25 yeguas gestantes, criollas, adultas, de un mismo establecimiento ubicado en el departamento de Colonia, Uruguay. Para la

inclusión de los animales se tuvo en cuenta que estuvieran sanos; se determinaron variables de rutina por métodos paraclínicos (bioquímica sanguínea, hemograma completo). Solo las yeguas que se encontraron sanas (definición que no incluye obesidad) al momento del muestreo se mantuvieron en el estudio. Todos los animales se encontraban bajo las mismas condiciones de alimentación, estando todas en una pastura de campo natural, bajo las mismas condiciones de manejo y bienestar.

Los animales se categorizaron en dos grupos: Normopeso (n=14) y Obeso (n=11), según la escala de condición corporal (CC) de Henneke et al., (1983). Tomándose como Normopeso (CC<7) y Obeso (CC>7). Se evaluó mediante observación y palpación de los depósitos de tejido adiposo por dos observadores experientes. Los períodos gestacionales (PerGest) establecidos para las observaciones y toma de muestras fueron entre 3 y 5 meses de gestación (PerGest 1), entre 8 y 9 meses (PerGest 2) y el último mes de gestación (PerGest 3).

Para la toma de muestras de sangre se realizó un ayuno de 12 horas. Las muestras se obtuvieron mediante punción de la vena yugular, y se dividieron en 3 submuestras. Una de ellas en un tubo con EDTA para la realización de hemograma, otra en tubo sin anticoagulante para la realización de funcional hepático, perfil renal y determinaciones hormonales, y una tercer submuestra en tubo con fluoruro de sodio y EDTA para la determinación de la glicemia.

Hematología y bioquímica sérica

El hemograma se realizó en un contador hematológico (Orphée, Mythic 18 Vet, Ginebra, Suiza). Para el recuento diferencial de los leucocitos y valoración de la morfología celular se realizó un frotis sanguíneo teñido con May Grünwald – Giemsa el cual fue evaluado con microscopio Nikon Eclipse E100.

El funcional hepático y el perfil renal se determinaron en suero en un equipo automático CB 350i (Wiener lab Group, Rosario, Argentina) utilizando reactivos y controles comerciales del mismo proveedor. Se determinó glucosa (referencia 1400060), aspartato aminotransferasa (referencia 1752360), fosfatasa alcalina sérica (referencia 1361402), glutamil transferasa (referencia 1421404), proteínas totales (referencia 1690009), albúmina (referencia 1690008), globulinas, triglicéridos (referencia 1780111), colesterol (referencia 1220114), bilirrubina total (referencia 1120008), urea (referencia 1260360), y creatinina (referencia 1260360).

El Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria utiliza los rangos de referencia de Oregon State University, dado que no cuenta con rangos de referencia propios para equinos.

Determinación hormonal

La determinación de insulina se hizo por un ensayo inmunoradiométrico utilizando kits comerciales (INS-IRMA kit DIA Source Immune Assays, Belgium). Las muestras se corrieron en duplicado en un solo ensayo. La sensibilidad fue

de 1.2 $\mu\text{UI/mL}$ y el coeficiente de variación Intra ensayo para los controles 1 (22.8 $\mu\text{UI/mL}$) y (75.2 $\mu\text{UI/mL}$) fueron de 5.9% y 7.1% respectivamente.

Las concentraciones séricas de leptina y adiponectina fueron determinadas mediante radioinmunoanálisis (RIA) de fase líquida utilizando kits comerciales Multi-Species Leptin kit (RIA kit, Millipore, USA). El límite de detección para la leptina fue 1,2 ng/mL y el CV intraensayo fue de 12%. Para la adiponectina, el límite de detección fue de 0,59 ng/mL y el CV intraensayo fue de 9%.

Determinación de proxies

Con los valores de glucosa e insulina basal se calculó el índice HOMA (Ribeiro, Ribeiro, Paz, Gobesso & Faleiros, 2020), considerándose como IR a valores >2.71 (Geloneze & Tambascia, 2006; Ribeiro et al., 2020).

HOMA-IR: $\text{Glucosa (mg/dL)} \times 0.0555 \times \text{Insulina (}\mu\text{UI/mL)} / 22.5$

Análisis estadístico

Los datos se analizaron a través del paquete estadístico Statistical Analysis System - SAS. Se chequeó la normalidad de los datos por el Procedimiento Univariate (SAS) y aquellas variables que no eran normales fueron transformadas con logaritmo. Los datos se analizaron por el procedimiento mixto incluyendo en el modelo estadístico la categoría de condición corporal (normopeso u obeso) y el periodo gestacional (PerGest 1, 2 y 3) y la interacción entre ambos. Las diferencias entre medias se analizaron por test de Tukey. Se consideró significativo cuando $P < 0,05$ y tendencia $P < 0,1$.

13.RESULTADOS

La condición corporal se vio afectada por el período gestacional ($p = 0,0003$) (Figura 1 a), observándose un aumento notorio entre la observación 1 ($6,6 \pm 0,15$) y la 2 ($7,8 \pm 0,26$) ($p < 0,0001$). Este incremento se explica por el aumento observado en las yeguas normopesas entre el PerGest 1 y el PerGest 2 ($5,07 \pm 0,20$ vs $7,56 \pm 0,26$, $p < 0,0001$). Se observó diferencia entre los grupos solamente en PerGest 1 (normopesas $5,07 \pm 0,20$ vs obesas $8,18 \pm 0,23$, $p < 0,0001$).

Las concentraciones de leptina fueron afectadas por la condición corporal ($p = 0,0009$) (Figura 1 b), observándose diferencias entre grupos en el muestreo 1 (normopesas $5,51 \pm 0,95$ y obesas $8,68 \pm 1,11$ ng/mL, $p = 0,0343$) y en el 3 (normopesas $6,17 \pm 1,50$ y obesas $10,83 \pm 1,30$ ng/mL, $p = 0,0230$). En PerGest 2 tendieron a diferir (normopesas $7,12 \pm 1,22$ y obesas $11,60 \pm 2,12$ ng/mL, $p = 0,07$).

Las determinaciones de adiponectina no arrojaron variaciones significativas entre los momentos de muestreo, ni al comparar ambos grupos (Figura 1 c).

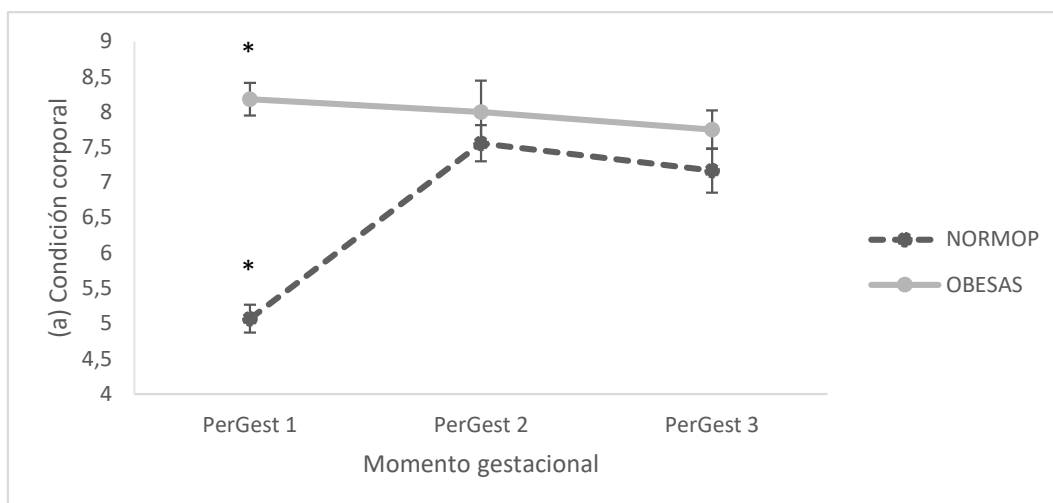


Figura 1a- Efecto del período gestacional y de grupo sobre la condición corporal en yeguas gestantes, normopesas ($CC < 7$) y obesas ($CC > 7$).

* diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$.

** tendencia a diferir, $p < 0,1$.

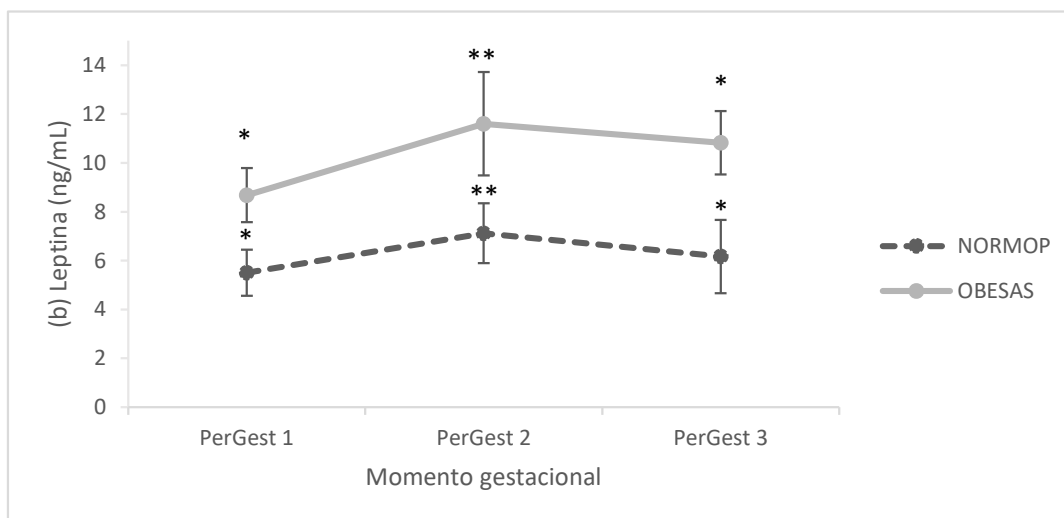


Figura 1 b- Efecto del período gestacional y de grupo sobre la leptina (ng/mL), en yeguas gestantes, normopesas ($CC < 7$) y obesas ($CC > 7$).

* diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$.

** tendencia a diferir, $p < 0,1$.

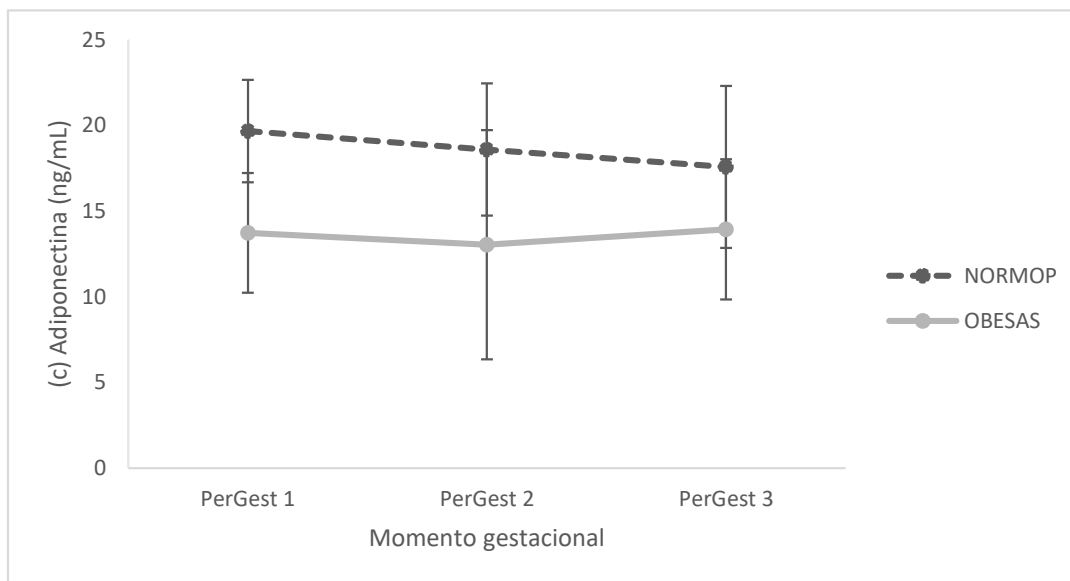


Figura 1 c- Efecto del período gestacional y de grupo sobre la adiponectina ng/mL, en yeguas gestantes, normopesas ($CC < 7$) y obesas ($CC > 7$).

* diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$.

** tendencia a diferir, $p < 0,1$.

La glicemia se vio afectada por el período gestacional ($p < 0,0001$), la condición corporal ($p = 0,0497$) y la interacción entre ambos factores ($p = 0,0003$) (Figura 2 a). Solo se observaron diferencias entre los grupos en el momento 1 (normopesas $53 \pm 2,91$ mg/dL y obesas $79,40 \pm 3,31$ mg/dL, $p < 0,0001$). Las normopesas tuvieron un aumento en la glicemia entre los muestreos 1 y 2 ($53 \pm 2,91$ y $85,67 \pm 3,49$ mg/dL, $p < 0,0001$). Para las obesas no se detectaron variaciones durante la gestación.

La insulina se vio afectada por el momento gestacional ($p = 0,004$) (Figura 2 b). Las concentraciones fueron mayores en las obesas respecto a las normopesas en PerGest1 (normopesas $7,27 \pm 1,36$ y obesas $13,48 \pm 1,55$ μ UI/mL) ($p = 0,0045$). Para el grupo de normopesas, se observó un incremento importante entre el PerGest 1 ($7,27 \pm 1,36$ μ UI/mL) y 2 ($17,51 \pm 1,63$ μ UI/mL) ($p < 0,0001$), y una tendencia a disminuir entre PerGest 2 ($17,51 \pm 1,63$ μ UI/mL) y 3 ($12,18 \pm 2,45$ μ UI/mL) ($p = 0,078$). En el caso de las obesas no hubo alteraciones significativas a lo largo de la gestación.

El índice HOMA por su parte se vio influenciado por el período gestacional ($p = 0,0011$) y tendió a afectarse por la interacción entre período gestacional y condición corporal ($p = 0,069$) (Figura 2 c). Hubo diferencia entre grupos en PerGest 1 (normopesas $1,06 \pm 0,31$ y obesas $2,70 \pm 0,36$) ($p = 0,0013$). Las normopesas mostraron un aumento importante entre los momentos 1 ($1,06 \pm 0,31$) y 2 ($3,76 \pm 0,37$) ($p < 0,0001$); y una tendencia a disminuir entre 2 ($3,76 \pm 0,37$) y 3 ($2,55 \pm 0,56$) ($p = 0,08$). Las obesas no manifestaron variaciones a lo largo del estudio.

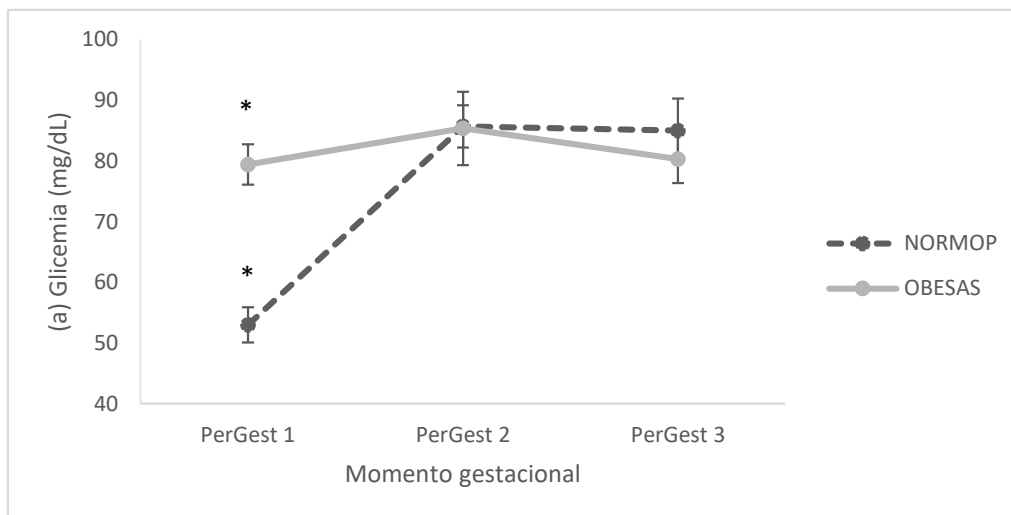


Figura 2 a- Efecto del período gestacional y de grupo sobre la glicemia (mg/dL) en yeguas gestantes, normopesas (CC<7) y obesas (CC>7).

* diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$.

** tendencia a diferir, $p < 0,1$.

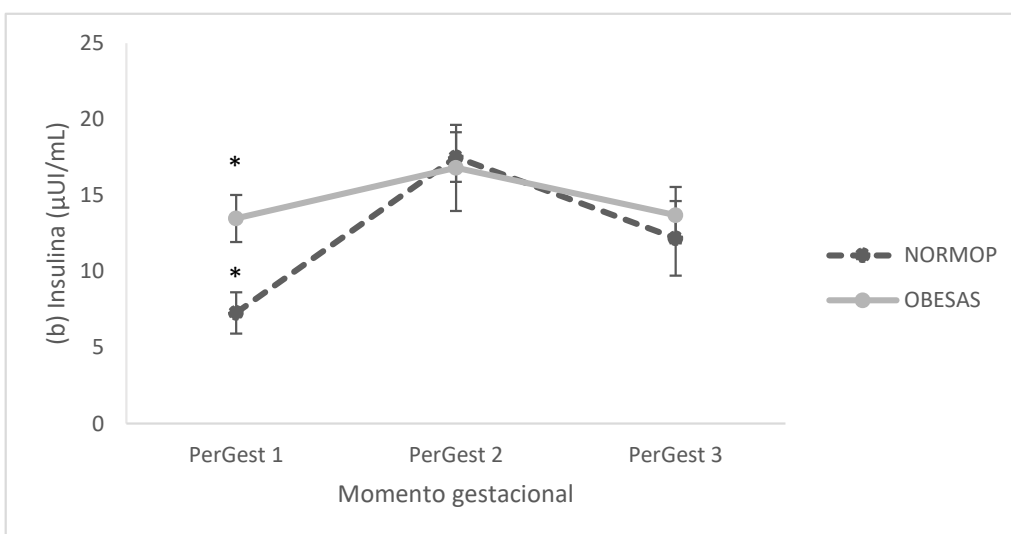


Figura 2 b- Efecto del período gestacional y de grupo sobre la insulinemia (μUI/mL) en yeguas gestantes, normopesas (CC<7) y obesas (CC>7).

* diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$.

** tendencia a diferir, $p < 0,1$.

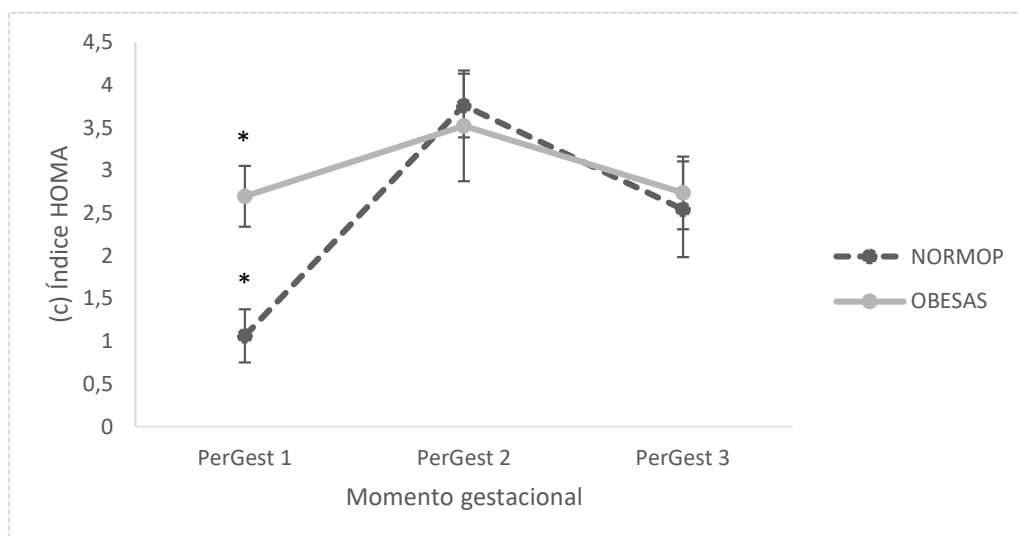


Figura 2. c- Efecto del período gestacional y de grupo sobre el índice HOMA en yeguas gestantes, normopesas ($CC < 7$) y obesas ($CC > 7$).

* diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$.

** tendencia a diferir, $p < 0,1$.

14. DISCUSIÓN

La condición corporal sufrió modificaciones notorias a lo largo del período gestacional, eliminándose la diferencia que existía entre grupos, en desacuerdo con lo reportado por Robles et al. (2018) quienes observaron que la diferencia de condición entre normopesas y obesas se mantuvo durante la gestación. En nuestro estudio, el grupo de normopesas tuvo un aumento entre PerGest 1 y PerGest 2, para luego mantenerse estable. El grupo de obesas, por su parte, no manifestó alteraciones de este tipo durante la gestación. Las diferencias entre estudios podrían atribuirse a diferencias raciales, ya que en nuestro estudio se realizó en yeguas de la raza criolla, una raza conocida por su predisposición a la obesidad (Cantarelli et al., 2018) mientras que Robles et al. (2018) utiliza razas Silla frances y Anglo-arabes. Otro punto a tener en cuenta es el manejo, ya que en nuestro trabajo los animales estuvieron siempre en pasturas de campo natural, mientras que en el de Robles et al. (2018) se encontraban estabulados y bajo otros planos nutricionales.

Como se hipotetizaba, los niveles de leptina fueron mayores en el grupo de animales obesos (Fitzgerald & McManus, 2000; Buff et al., 2002; Gentry et al., 2002; Kearns et al., 2006; Smith, 2017; Robles et al., 2018; Sessions-Bresnahan, Heuberger & Carnevale, 2018). Esta diferencia se mantuvo prácticamente sin variaciones durante todo el período de estudio, y la leptinemia no reflejó el aumento en condición corporal del grupo de normopesas. Esto concuerda con reportes anteriores; Gentry et al. (2002) encontraron diferencias en los niveles de esta hormona en un grupo de yeguas con alta condición corporal; Van Weyenberg et al. (2013) observaron lo mismo en un grupo de ponies obesos. Sugerimos que estas diferencias pueden ser explicadas por una resistencia a la leptina en los individuos categorizados como obesos desde el inicio del estudio.

En el caso de la adiponectina no se constatan diferencias entre grupos, hallazgo que sugiere que no hay influencia de la condición corporal en dicha adipocitina en la población estudiada. Esto está en desacuerdo con lo reportado en otros trabajos, en los que se encontraron valores menores en animales obesos o se observó una correlación inversa entre la hormona y la condición corporal (Kearns et al., 2006; Wooldridge et al., 2012; Robles et al., 2018). Tampoco hubo variación entre momentos gestacionales, como sí reportaron Robles et al. (2018) para el grupo de normopesas, en las que observaron un incremento. De todas maneras, como se observa en la gráfica el error estándar encontrado en esta variable fue grande; es decir, la variación individual en esta hormona es relevante.

La glicemia basal se vio influenciada por la condición corporal, el período gestacional y la interacción entre ellos. Presentó una diferencia notoria entre grupos al inicio del estudio, contrario a lo reportado por Robles et al. (2018). En PerGest 1, las concentraciones fueron notoriamente menores en normopesas, para luego observarse un importante aumento. En PerGest 2 ya no se observaron diferencias con las obesas, manteniéndose de esta forma hasta el PerGest 3. Posiblemente las variaciones observadas se vinculan con las de insulina e índice HOMA (ver discusión debajo). El grupo de obesas no manifestó variaciones en este análisis entre los distintos momentos de muestreo.

En concordancia con lo reportado por Robles et al. (2018), la insulina basal se vio afectada por la etapa gestacional. Si bien la CC como efecto fijo no afectó la concentración de insulina, si se encontraron diferencias por Tukey entre grupos en momentos específicos de la gestación, ya que las yeguas obesas tuvieron mayores concentraciones de insulina en el PerGest1 respecto de las normopesas. Smith et al. (2017) y Robles et al. (2018) no reportaron diferencias en la concentración de insulina acorde a la condición corporal, y esto puede deberse a la raza incluida en el estudio. El grupo de normopesas, tuvo un aumento significativo entre PerGest 1 y PerGest 2, que acompañó el incremento en la glicemia; hacia PerGest 3 tendió a disminuir sus concentraciones séricas. Las yeguas obesas no presentaron variaciones entre los momentos analizados.

El índice HOMA fue afectado por el período gestacional mientras que la interacción entre período gestacional y condición corporal tendió a ser significativa. La interacción se explica por las diferencias encontradas en el PerGest 1, en el cual las yeguas obesas presentaron valores HOMA compatibles con insulino resistencia. En las yeguas normopesas hubo un aumento del PerGest 1 al PerGest 2, expresando valores de HOMA compatibles con insulino resistencia que luego tendió a disminuir entre PerGest 2 y PerGest 3, probablemente acompañando la tendencia a la disminución observada para la insulina entre los mismos momentos en dicho grupo. En las obesas, por su parte, no se encontraron diferencias entre los PerGest, y se mantuvieron por encima del límite establecido prácticamente en los tres momentos. Esos valores indicativos de insulino resistencia mantenidos durante todo el período de estudio difiere parcialmente de lo establecido por Robles et al. (2018) quienes reportan un incremento en la insulino resistencia en el mismo grupo de animales, pero hacia el final del período gestacional. Si bien en un estudio se concluye que no hay ventajas en la utilización de proxies frente a la determinación de insulina basal para el diagnóstico de insulino resistencia (Lindåse, Nostell, Bergsten, Forslund & Bröjer, 2021), en nuestro caso fue posible diferenciar animales sanos

de insulino resistentes, aún cuando estos últimos presentaban valores de insulina dentro de los rangos normales.

Analizadas en conjunto, las gráficas de glicemia, insulina e índice HOMA, para el grupo de normopesas, vemos como las tres curvas sufren un incremento entre PerGest 1 y 2. A partir de esto podemos interpretar que existe un desarrollo de insulino resistencia reflejada en aumento del índice HOMA, por lo que se da un incremento en la glicemia, que a su vez deriva en un aumento de los niveles de insulina. Entre PerGest 2 y 3, se observa que la glicemia se mantiene inalterada, mientras que insulina tiende a disminuir, lo que a su vez se refleja nuevamente en el índice HOMA. En este grupo, estos cambios seguramente se expliquen por el desarrollo de resistencia a la insulina por parte de los tejidos maternos; fenómeno que se sabe ocurre de forma fisiológica durante la gestación (Fowden et al., 1984; Morresey, 2012). A pesar de esto, sugerimos que durante la gestación ocurren cambios que permiten el depósito de tejido graso sin depender de la insulina. De esta manera se le atribuiría el aumento en la CC, al aumento en la glucosa circulante.

En el caso del grupo de obesas las variables mencionadas en el párrafo anterior se mantuvieron estables durante el período de estudio. Lo que podría ser indicativo de un metabolismo alterado de forma basal, sin incidencia de las alteraciones fisiológicas propias de la gestación.

Cabe destacar la gran relevancia de los desequilibrios metabólicos, más concretamente de las alteraciones insulínicas mencionadas en esta tesis. Ya se ha demostrado que la exposición a hiperinsulinemias desencadena cuadros de laminitis (Asplin et al., 2007; de Laat et al., 2010; de Laat, Sillence et al., 2012). Además, Robles et al. (2018) muestran que la obesidad en la yegua gestante impacta también en la salud del potrillo. Este grupo reportó que hijos de yeguas obesas presentaron, en momentos puntuales, mayor IR, cuadros de inflamación crónica, y mayor proporción de lesiones de osteocondrosis; al compararlos con un grupo de potrillos nacidos de yeguas con una CC normal. Por su parte, otros estudios informaron que potrillos de yeguas sobrealimentadas en el último tercio de la gestación presentaron un incremento en número y tamaño de islotes de Langerhans, alteración en desarrollo y diferenciación de fibras de músculo esquelético. Además, estos animales presentaron alteraciones en la expresión de genes vinculados a efectos de la insulina y captación de glucosa, por lo que concluyen que estos cambios ocurridos pueden resultar en alteraciones metabólicas e influir negativamente en el desempeño deportivo en la vida adulta (Bradbery, Coverdale, Hammer et al., 2021; Bradbery, Coverdale, Hartz et al., 2021).

15. CONCLUSIONES

Concluimos que el metabolismo glucídico, leptina circulante y la sensibilidad a la insulina se ven influenciadas por la gestación y por la condición corporal. Se observó como las variaciones en insulina y glucosa basales, así como en insulino resistencia reflejado en el índice HOMA, que ocurren durante la preñez de forma fisiológica, quedan enmascaradas por un metabolismo ya alterado de forma basal en los animales obesos.

16. BIBLIOGRAFÍA

- Arfuso, F., Giannetto, C., Bazzano, M., Assenza, A., & Piccione, G. (2021). Physiological correlation between hypothalamic–pituitary–adrenal axis, leptin, UCP1 and lipid panel in mares during late pregnancy and early postpartum period. *Animals*, 11(7), 2051.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., ... Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1), 79–83.
- Asplin, K. E., Sillence, M. N., Pollitt, C. C., & McGowan, C. M. (2007). Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *The Veterinary Journal*, 174(3), 530-535.
- Bamford, N. J., Baskerville, C. L., Harris, P. A., & Bailey, S. R. (2015). Postprandial glucose, insulin, and glucagon-like peptide-1 responses of different equine breeds adapted to meals containing micronized maize. *Journal of Animal Science*, 93(7), 3377-3383.
- Bamford, N. J., Potter, S. J., Harris, P. A., & Bailey, S. R. (2014). Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. *Domestic Animal Endocrinology*, 47, 101-107.
- Bertin, F. R., Ruffin-Taylor, D., & Stewart, A. J. (2018). Insulin dysregulation in horses with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(4), 1420–1427.
- Bertin, F. R., & De Laat, M. A. (2017). The diagnosis of equine insulin dysregulation. *Equine Veterinary Journal*, 49(5), 570-576.
- Bertin, F. R., & Fraser, N. S. (2020). Diseases of the Endocrine Pancreas and Equine Metabolic Syndrome. En F. R. Bertin & N. S. Fraser, *Equine Endocrinology* (pp. 60-90). Boston: CABI.
- Bradbery, A. N., Coverdale, J. A., Hammer, C. J., Dunlap, K. A., Leatherwood, J. L., & Satterfield, M. C. (2021). Effect of maternal overnutrition on predisposition to insulin resistance in the foal: Foal skeletal muscle development and insulin signaling. *Domestic Animal Endocrinology*, 77, 106648.
- Bradbery, A. N., Coverdale, J. A., Hartz, C. J., Millican, A. A., Goehring, M. S., Fikes, K. K., ... Satterfield, M. C. (2021). Effect of maternal overnutrition on predisposition to insulin resistance in the foal: Maternal parameters and foal pancreas histoarchitecture. *Animal Reproduction Science*, 227, 106720.
- Buff, P. R., Dodds, A. C., Morrison, C. D., Whitley, N. C., McFadin, E. L., Daniel, J. A., ... Keisler, D. H. (2002). Leptin in horses: tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *Journal of Animal Science*, 80(11), 2942-2948.

- Butte N. F. (2000). Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5 Suppl), 1256–1261.
- Cantarelli, C., Dau, S. L., Stefanello, S., Azevedo, M. S., De Bastiani, G. R., Palma, H. E., ... De La Côte, F. D. (2018). Evaluation of oral sugar test response for detection of equine metabolic syndrome in obese Crioulo horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 63, 31–37.
- Carter, R. A., Treiber, K. H., Geor, R. J., Douglass, L., & Harris, P. A. (2009). Prediction of incipient pasture-associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies. *Equine Veterinary Journal*, 41(2), 171-178.
- Cartmill, J. A., Thompson Jr, D. L., Del Vecchio, R. P., Storer, W. A., & Crowley, J. C. (2006). Leptin secretion in horses: effects of dexamethasone, gender, and testosterone. *Domestic Animal Endocrinology*, 31(2), 197-210.
- Cartmill, J. A., Thompson Jr, D. L., Storer, W. A., Gentry, L. R., & Huff, N. K. (2003). Endocrine responses in mares and geldings with high body condition scores grouped by high vs. low resting leptin concentrations. *Journal of Animal Science*, 81(9), 2311–2321.
- Chameroy, K. A., Frank, N., Elliott, S. B., & Boston, R. C. (2016). Comparison of plasma active glucagon-like peptide 1 concentrations in normal horses and those with equine metabolic syndrome and in horses placed on a high-grain diet. *Journal of Equine Veterinary Science*, 40, 16-25.
- de Laat, M. A., Kyaw-Tanner, M. T., Sillence, M. N., McGowan, C. M., & Pollitt, C. C. (2012). Advanced glycation endproducts in horses with insulin-induced laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(1-2), 395–401.
- de Laat, M. A., McGowan, C. M., Sillence, M. N., & Pollitt, C. C. (2010). Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 42(2), 129-135.
- de Laat, M. A., McGree, J. M., & Sillence, M. N. (2016). Equine hyperinsulinemia: investigation of the enteroinsular axis during insulin dysregulation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 310(1), 61-72.
- de Laat, M. A., Sillence, M. N., McGowan, C. M., & Pollitt, C. C. (2012). Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinaemia and lamellar histopathology in Standardbred horses. *The Veterinary Journal*, 191(3), 317-322.
- Duckworth, W. C., Bennett, R. G., & Hamel, F. G. (1998). Insulin degradation: progress and potential. *Endocrine Reviews*, 19(5), 608-624.

- Dunbar, L. K., Mielnicki, K. A., Dembek, K. A., Toribio, R. E., & Burns, T. A. (2016). Evaluation of Four Diagnostic Tests for Insulin Dysregulation in Adult Light-Breed Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(3), 885–891.
- Durham, A. E., Frank, N., McGowan, C. M., Menzies-Gow, N. J., Roelfsema, E., Vervuert, I., ... Fey, K. (2019). ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 335-349.
- Ebinuma, H., Miyazaki, O., Yago, H., Hara, K., Yamauchi, T., & Kadowaki, T. (2006). A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clinica Chimica Acta*, 372(1-2), 47–53.
- Evans, J. W. (1971). Effect of fasting, gestation, lactation and exercise on glucose turnover in horses. *Journal of Animal Science*, 33(5), 1001-1004.
- Fields, M. (1998). Nutritional factors adversely influencing the glucose/insulin system. *Journal of the American College of Nutrition*, 17(4), 317-321.
- Fitzgerald, B. P., & McManus, C. J. (2000). Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. *Biology of Reproduction*, 63(1), 335-340.
- Fowden, A. L., Comline, R. S., & Silver, M. (1984). Insulin secretion and carbohydrate metabolism during pregnancy in the mare. *Equine Veterinary Journal*, 16(4), 239–246.
- Fowden, A. L., Giussani, D. A., & Forhead, A. J. (2020). Physiological development of the equine fetus during late gestation. *Equine Veterinary Journal*, 52(2), 165–173.
- Frank, N., Elliott, S. B., Brandt, L. E., & Keisler, D. H. (2006). Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(9), 1383–1390.
- Frank, N., Geor, R. J., Bailey, S. R., Durham, A. E., & Johnson, P. J (2010). Equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(3), 467–475.
- Frank, N., & Tadros, E. M. (2014). Insulin dysregulation. *Equine Veterinary Journal*, 46(1), 103-112.
- Garofalo, C., & Surmacz, E. (2006). Leptin and cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 207(1), 12–22.
- Geloneze, B., & Tambascia, M. A. (2006). Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 50, 208-215.

- Gentry, L. R., Thompson Jr, D. L., Gentry Jr, G. T., Davis, K. A., Godke, R. A., & Cartmill, J. A. (2002). The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *Journal of Animal Science*, 80(10), 2695-2703.
- Geor, R. J. (2008). Metabolic predispositions to laminitis in horses and ponies: obesity, insulin resistance and metabolic syndromes. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(12), 753-759.
- Gordon, M. E., McKeever, K. H., Betros, C. L., & Manso Filho, H. C. (2007). Plasma leptin, ghrelin and adiponectin concentrations in young fit racehorses versus mature unfit standardbreds. *The Veterinary Journal*, 173(1), 91–100.
- Habegger, K. M., Heppner, K. M., Geary, N., Bartness, T. J., DiMarchi, R., & Tschöp, M. H. (2010). The metabolic actions of glucagon revisited. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(12), 689-697.
- Hart, K. A., Wochele, D. M., Norton, N. A., McFarlane, D., Wooldridge, A. A., & Frank, N. (2016). Effect of Age, Season, Body Condition, and Endocrine Status on Serum Free Cortisol Fraction and Insulin Concentration in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(2), 653–663.
- 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.
- Heshka, J. T., & Jones, P. J. (2001). A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. *Life Sciences*, 69(9), 987-1003.
- Holz IV, G. G., Kiihtreiber, W. M., & Habener, J. F. (1993). Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37). *Nature*, 361, 362-365.
- Hopkins, T. A., Ouchi, N., Shibata, R., & Walsh, K. (2007). Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 74(1), 11–18.
- Houseknecht, K. L., & Portocarrero, C. P. (1998). Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domestic Animal Endocrinology*, 15(6), 457-475.
- Katagiri, H., Yamada, T., & Oka, Y. (2007). Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals. *Circulation Research*, 101(1), 27-39.
- Kearns, C. F., McKeever, K. H., Roegner, V., Brady, S. M., & Malinowski, K. (2006). Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. *Veterinary Journal*, 172(3), 460–465.

- Kinsella, H. M., Hostnik, L. D., Snyder, H. A., Mazur, S. E., Kamr, A. M., Burns, T. A., ... Toribio, R. E. (2022). Comparison of insulin sensitivity between healthy neonatal foals and horses using minimal model analysis. *PLoS One*, 17(1), e0262584.
- Knowles, E. J., & Grieve, L. (2020). Clinical insights: Equine obesity. *Equine Veterinary Journal*, 52(5), 635-638.
- Lacombe, V. A. (2014). Expression and regulation of facilitative glucose transporters in equine insulin-sensitive tissue: from physiology to pathology. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 409547.
- Lago, F., Dieguez, C., Gómez-Reino, J., & Gualillo, O. (2007). Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 3, 716-724.
- Lawrence, L. M., Williams, J., Soderholm, L. V., Roberts, A. M., & Hintz, H. F. (1995). Effect of feeding state on the response of horses to repeated bouts of intense exercise. *Equine Veterinary Journal*, 27(1), 27-30.
- Lebovitz H. E. (2001). Insulin resistance: definition and consequences. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 109(2), 135–148.
- Lewis, S. L., Holl, H. M., Streeter, C., Posbergh, C., Schanbacher, B. J., Place, N. J., ... Brooks, S. A. (2017). Genomewide association study reveals a risk locus for equine metabolic syndrome in the Arabian horse. *Journal of Animal Science*, 95(3), 1071-1079.
- Lindåse, S., Nostell, K., Bergsten, P., Forslund, A., & Bröjer, J. (2021). Evaluation of fasting plasma insulin and proxy measurements to assess insulin sensitivity in horses. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 78.
- Lorenzo, C., Wagenknecht, L. E., Rewers, M. J., Karter, A. J., Bergman, R. N., Hanley, A. J., & Haffner, S. M. (2010). Disposition index, glucose effectiveness, and conversion to type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care*, 33(9), 2098-2103.
- McCue, M. E., Geor, R. J., & Schultz, N. (2015). Equine metabolic syndrome: a complex disease influenced by genetics and the environment. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(5), 367-375.
- McGowan, C. M., Frost, R., Pfeiffer, D. U., & Neiger, R. (2004). Serum insulin concentrations in horses with equine Cushing's syndrome: response to a cortisol inhibitor and prognostic value. *Equine Veterinary Journal*, 36(3), 295–298.
- Meier, A. D., de Laat, M. A., Reiche, D. B., & Sillence, M. N. (2020). Glucagon-like peptide-1, insulin-like growth factor-1, and adiponectin in insulin-dysregulated ponies: effects of feeding a high nonstructural carbohydrate diet and association with prospective laminitis. *Domestic Animal Endocrinology*, 71, 106397.

- Meikle, A., Chilibraste, P., Carriquiry, M., Sosa, C., Abecia, J. A., de Brun, V., ... Adrien, M. D. L. (2018). Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. *Animal Reproduction*, 15(1), 899-911.
- Mills, P. C., Ng, J. C., Kramer, H., & Auer, D. E. (1997). Stress response to chronic inflammation in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 29(6), 483–486.
- Morgan, R. A., McGowan, T. W., & McGowan, C. M. (2014). Prevalence and risk factors for hyperinsulinaemia in ponies in Queensland, Australia. *Australian Veterinary Journal*, 92(4), 101-106.
- Morgan, R., Keen, J., & McGowan, C. (2015). Equine metabolic syndrome. *Veterinary Record*, 177(7), 173-179.
- Morresey, P.R. (2012). Metabolic Syndrome in the Pregnant Mare. En *58th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* (Vol. 58, pp. 339-344). AAEP, Anaheim.
- Muniyappa, R., Lee, S., Chen, H., & Quon, M. J. (2008). Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(1), E15-E26.
- Nadal, M. R., Thompson Jr, D. L., & Kincaid, L. A. (1997). Effect of feeding and feed deprivation on plasma concentrations of prolactin, insulin, growth hormone, and metabolites in horses. *Journal of Animal Science*, 75(3), 736-744.
- Norton, E. M., Schultz, N. E., Rendahl, A. K., Mcfarlane, D., Geor, R. J., Mickelson, J. R., & McCue, M. E. (2019). Heritability of metabolic traits associated with equine metabolic syndrome in Welsh ponies and Morgan horses. *Equine Veterinary Journal*, 51(4), 475-480.
- Pajvani, U. B., Du, X., Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Schulthess, T., ... Scherer, P. E. (2003). Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin: implications for metabolic regulation and bioactivity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9073-9085.
- Pan, W., & Kastin, A. J. (2007). Adipokines and the blood-brain barrier. *Peptides*, 28(6), 1317-1330.
- Pardié, M., Carzoli, A., & Meikle, A. (2021). Equine Metabolic Syndrome and Laminitis: a case study. *Revista de Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay* (en prensa).
- Pazinato, F. M., da Rosa Curcio, B., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., Wendt, C. G., Moreira, F., ... 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.
- Peake, P. W., Kriketos, A. D., Campbell, L. V., Shen, Y., & Charlesworth, J. A. (2005). The metabolism of isoforms of human adiponectin: studies in human subjects

and in experimental animals. *European Journal of Endocrinology*, 153(3), 409-417.

- Pearson, L. (2015). *Adiponectin in equine reproduction* (Doctoral dissertation). Washington State University College of Veterinary Medicine, Washington.
- Radin, M. J., Sharkey, L. C., & Holycross, B. J. (2009). Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(2), 136-156.
- Ralston, S. L. (2002). Insulin and glucose regulation. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 18(2), 295-304.
- Ribeiro, R. M., Ribeiro, D. S., Paz, C. F. R., Gobesso, A. A., & Faleiros, R. R. (2020). Desregulação da insulina em equinos com obesidade induzida. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40, 39-45.
- Robles, M., Nouveau, E., Gautier, C., Mendoza, L., Dubois, C., Dahirel, M., ... 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), e0190309.
- Schäffler, A., Schölmerich, J., & Salzberger, B. (2007). Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends in Immunology*, 28(9), 393-399.
- Schraw, T., Wang, Z. V., Halberg, N., Hawkins, M., & Scherer, P. E. (2008). Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology*, 149(5), 2270–2282.
- Selim, S., Elo, K., Jaakkola, S., Karikoski, N., Boston, R., Reilas, T., ... Kokkonen, T. (2015). Relationships among body condition, insulin resistance and subcutaneous adipose tissue gene expression during the grazing season in mares. *PLoS One*, 10(5), e0125968.
- 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.
- Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. J. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of Lipid Research*, 48(6), 1253-1262.
- Silver, M., & Fowden, A. L. (1982). Uterine prostaglandin F metabolite production in relation to glucose availability in late pregnancy and a possible influence of diet on time of delivery in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 32, 511-519.
- Simmons, M. A., Battaglia, F. C., & Meschia, G. (1979). Placental transfer of glucose. *Journal of Developmental Physiology*, 1(3), 227-243.

- Smith, S., Marr, C. M., Dunnett, C., & Menzies-Gow, N. J. (2017). The effect of mare obesity and endocrine function on foal birthweight in Thoroughbreds. *Equine Veterinary Journal*, 49(4), 461–466.
- Tóth, F., Frank, N., Elliott, S. B., Geor, R. J., & Boston, R. C. (2008). Effects of an intravenous endotoxin challenge on glucose and insulin dynamics in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 69(1), 82–88.
- Trujillo, M. E., & Scherer, P. E. (2006). Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocrine Reviews*, 27(7), 762-778.
- Van Assche, F. A., Hoet, J. J., & Jack, P. M. (1984). Endocrine pancreas of the pregnant mother, fetus, and newborn. En R.W. Beard, y P.W. Nathanielsz (Eds.), *Fetal physiology and medicine* (2^a ed., pp. 127-152). Ámsterdam: Elsevier.
- 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.
- Waller, A. P., Burns, T. A., Mudge, M. C., Belknap, J. K., & Lacombe, V. A. (2011a). Insulin resistance selectively alters cell-surface glucose transporters but not their total protein expression in equine skeletal muscle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 315-321.
- Waller, A. P., Kohler, K., Burns, T. A., Mudge, M. C., Belknap, J. K., & Lacombe, V. A. (2011b). Naturally occurring compensated insulin resistance selectively alters glucose transporters in visceral and subcutaneous adipose tissues without change in AS160 activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(9), 1098–1103.
- Williams, C. A., Kronfeld, D. S., Staniar, W. B., & Harris, P. A. (2001). Plasma glucose and insulin responses of Thoroughbred mares fed a meal high in starch and sugar or fat and fiber. *Journal of Animal Science*, 79(8), 2196-2201.
- Whitehead, J. P., Richards, A. A., Hickman, I. J., Macdonald, G. A., & Prins, J. B. (2006). Adiponectin—a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 8(3), 264-280.
- Wooldridge, A. A., Edwards, H. G., Plaisance, E. P., Applegate, R., Taylor, D. R., Taintor, J., ... Judd, R. L. (2012). Evaluation of high-molecular weight adiponectin in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 73(8), 1230-1240.
- Wray, H., Elliott, J., Bailey, S. R., Harris, P. A., & Menzies-Gow, N. J. (2013). Plasma concentrations of inflammatory markers in previously laminitic ponies. *Equine Veterinary Journal*, 45(5), 546-551.
- Wylie, C. E., & Collins, S. N. (2010). Equine insulin resistance: The quest for sensitivity. *The Veterinary Journal*, 186(3), 275-276.
- Xu, A., Chan, K. W., Hoo, R. L., Wang, Y., Tan, K. C., Zhang, J., ... Lam, K. S. (2005). Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin

by inhibiting its secretion from adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), 18073-18080.

Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8152-8161.