

Effects of corn oil on the volatile fatty acids in horses with induced gastric ulcers

Efecto del aceite de maíz sobre los ácidos grasos volátiles en caballos con úlceras gástricas inducidas

José Martínez A,^{1*} Ph.D, Jorge Carmona,² Ph.D, Geraldo Silveira A,³ Ph.D.

¹Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Línea de Investigación en Medicina y Cirugía Equina (LIMCE), Grupo Centauro, Carrera 75 N° 65-87. AA 1226. Medellín, Colombia. ²Universidad de Caldas, Departamento de Salud Animal, Grupo de Investigación Terapia Regenerativa, Calle 65 No 26-10, Manizales, Colombia. ³Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de veterinária, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Brasil. *Correspondence: jose.martinez@udea.edu.co

Received: July 2015; Accepted: February 2016.

ABSTRACT

Objective. To determine the influence of corn oil on the volatile fatty acids (VFA) concentrations in the gastric juice in horses with phenylbutazone (PBZ) induced gastric ulcers and Correlate the gastroscopic findings with the VFA concentrations. **Materials and methods.** 15 horses were allotted in 3 groups. Group I (control) received placebo during first 6 days (induction period) and was treated with sucralfate for 2 weeks (treatment period). Groups II and III received PBZ during the induction phase. After 6 days, horses from group II received 70 mL of corn oil /100 kg of body weight/ po, twice a day, for 2 weeks and horses from group III received 90 mL of corn oil/100 kg of body weight/ po, twice a day, for 2 weeks. All horses were examined by gastroscopy at days 0, 7 and 21. The lesions were recorded and classified according to the number and severity. Samples from gastric fluid were taken to measure the concentrations of the acetic, propionic, butyric and lactic acids. **Results.** Both PBZ protocols produced lesions in the both non-glandular and glandular areas of the stomach. All the treatments produced healing of the injured mucosa glandular. Neither of the two corn oil treatments affected healing of the gastric ulcers located in the non-glandular area. **Conclusions.** The concentrations of acetic and butyric acids were highest in the gastric juice. The corn oil and sucralfate did not lead to differences in the concentration of acetic acid and butyric acid.

Keywords: Equine, stomach, gastric juices, endoscopy, sucralfate (*Sources: CAB, DeCs*).

RESUMEN

Objetivo. Determinar el efecto del aceite de maíz sobre la concentración de los ácidos grasos volátiles (AGV) en el jugo gástrico de caballos con úlceras gástricas inducidas con fenilbutazona (FBZ) y correlacionar los hallazgos gastroscópicos con las concentraciones de AGV. **Materiales y métodos.** 15 caballos fueron asignados en 3 grupos. El grupo I (control) recibió placebo durante los primeros 6 días (período de inducción) y fue tratado con sucralfato durante 2 semanas (período de tratamiento). Los grupos II y III recibieron FBZ en la fase de inducción. Después de 6 días, los caballos del grupo II recibieron 70 ml de aceite de maíz /100 kg de peso corporal / vo, dos veces al día, durante 2 semanas

y los caballos del grupo III recibieron 90 ml de aceite de maíz / 100 kg de peso corporal / vo, dos veces al día, durante 2 semanas. Todos los caballos fueron examinados por gastroscopia en el día 0, 7 y 21. Las lesiones fueron registradas y clasificadas según el número y severidad. Muestras de fluido gástrico se utilizaron para medir las concentraciones de los ácidos acético, propiónico, butírico y láctico. **Resultados.** Ambos protocolos de FBZ ocasionaron lesiones en las áreas aglandular y glandular del estómago. Todos los tratamientos reestablecieron el epitelio ulcerado de la mucosa glandular. Ninguno de los dos tratamientos a base de aceite de maíz reestablecieron el epitelio ulcerado de la zona aglandular del estómago. **Conclusiones.** Las concentraciones de los ácidos acético y butírico fueron más altas en el jugo gástrico. El aceite de maíz y el sucralfato no afectaron la concentración de ácido acético y ácido butírico.

Palabras clave: Equino, estómago, jugo gástrico, endoscopia, sucralfato (*Fuentes: CAB, DeCs*).

INTRODUCTION

Equine gastric ulcer syndrome (EGUS) is a multifactorial problem that could involve one or several parts of the stomach of this species, including the terminal oesophagus, proximal (squamous mucosa) stomach, distal (glandular mucosa) stomach, and proximal duodenum (1,2). The health of the equine stomach depends on the integrity of the mucosal areas (non-glandular and glandular), which is generated by protective mechanisms that counteract the effects of constant exposure to both, endogenous and exogenous gastroerosive agents (1).

The caustic action of the gastric hydrochloric acid is a primary cause of EGUS (1). However, as mentioned, EGUS is a multifactorial problem linked to the conditions of the animal (endogenous factors) and exogenous factors related to environmental conditions, such as the husbandry systems management and factors related with the wellness and healthiness of the animals with this condition. There is an extensive list of factors or direct causes involved in EGUS; these could include inherent factors such as gender, breed, age, and temperament. However, exogenous causes like training programs, level of competition, confinement level, concurrent medication (particularly, with non-steroidal anti-inflammatory drugs [NSAID]), inadequate feed management, and acid-fast bacteria producing metabolites, among others, are described in the literature as EGUS inducers (1,4).

Volatile fatty acids (VFA) such as butyric, propionic, acetic and valeric acids are derived from carbohydrate fermentation processes directed by gastric bacteria. VFA have been found to produce "*in vitro*" lesions in the non-glandular mucosa of the equine stomach (5, 6). However, in an early study it was observed that varying concentrations of VFA in stomach contents of horses fed diets based on hay or hay plus concentrate did not influence the appearance of gastric ulcers in these animals (7).

INTRODUCCIÓN

El síndrome de úlcera gástrica equina (SUGE) es de naturaleza multifactorial e involucra características anatómicas y eventos fisiológicos particulares que contribuyen a incrementar la presentación de lesiones ulcerativas en el estómago de esta especie, incluyendo parte terminal del esófago, estómago proximal (mucosa escamosa), estómago distal (mucosa glandular) y duodeno proximal (1,2). La sanidad gástrica depende de la integridad de las áreas de la mucosa (no glandular y glandular) que se genera por los mecanismos de protección a la constante exposición a diferentes agentes gastrolesivos tanto endógenos como exógenos (1).

La acción cáustica del ácido clorhídrico es una causa primaria del SUGE (1). Sin embargo, el SUGE es un problema multifactorial que relaciona condiciones del animal (factores endógenos) y factores exógenos asociados a condiciones de ambiente, como el sistema de explotación y manejo; además de los factores relacionados con el bienestar y el estado de salud. Existe una lista extensiva de factores o causas directas involucradas en el SUGE, donde se incluye entre los factores inherentes como el sexo, raza y temperamento. Entre las causas exógenas como los programas de entrenamiento, nivel de competición, confinamiento, medicaciones frecuentes (particularmente, con los antiinflamatorios no esteroideos [AINES]), inadecuado manejo alimentario y bacterias acidorresistentes; son descritos en la literatura como inductores de SUGE (1, 4).

Los ácidos grasos volátiles (AGV) como el butírico, propiónico, acético y valérico, son derivados de procesos fermentativos de carbohidratos por bacterias gástricas; sin embargo, los AGV han sido relacionados a producir "*in vitro*" lesiones en la mucosa no glandular de equinos (5, 6). Sin embargo, en un estudio se determinó variadas concentraciones de AGV en el contenido gástrico de caballos alimentados con dietas a base de heno o combinación de heno y concentrado que no influyeron en la aparición de úlceras gástricas (7).

On the other hand, ulcerative lesions in the non-glandular mucosa are directly related to the action of gastric acid on this stomach area. In contrast, glandular lesions are more commonly a secondary cause of the systemic and local toxic effects of NSAID, particularly in horses medicated with phenylbutazone (PBZ) (8). The systemic side effects of PBZ are related to nonspecific inhibition of the cyclooxygenase (COX) enzyme, which is necessary for the synthesis of prostaglandins (PGE₂) and nitric oxide favoring protection and normal perfusion of the glandular mucosa. On the other hand, NSAID (e.g., PBZ) induce direct epithelial damage of glandular mucosa cells of the stomach (9).

Physiological protective factors related to the glandular mucosa are stomach blood perfusion, gastric bicarbonate production, and mucus secretion. These factors are mainly influenced by the local production of prostaglandin E₂ (PGE₂). However, once COX-1 and 2 are inhibited non specifically by NSAID, such as PBZ, the PGE₂ concentration declines and glandular ulcers could appear (10).

Corn oil is a very good source of linoleic acid which is a precursor of arachidonic acid, which has the ability to increase PGE₂ production (10, 11). However, there is scarce information on how this substance could affect the healing process in horses with EGUS and how this could affect the concentration of VFA in gastric juice in these animals. Therefore, we developed an equine model of PBZ-induced gastric ulceration 1) to investigate the influence of this substance on the VFA concentrations in the gastric juice in the animals; and 2) to correlate the gastroscopic findings with the VFA concentrations.

MATERIAL AND METHODS

Animals. Fifteen clinically healthy crossbred horses (11 not pregnant mares and 4 geldings) with an age range between 5 to 20 years and weight range of 270 - 465 kg were included. All the horses came from a free-pasture husbandry system. Two weeks before starting the experiment, the animals were conditioned by deworming and vaccination. The horses were allocated in individual stalls and fed *Coastal Bermuda* hay and water *ad libitum*. Furthermore, they received a concentrate supplementation with 13% protein and administered twice daily in the proportion of 1% of body weight.

Study design. This randomized complete block study included three specific times. At time 0, all the horses were evaluated in clinical laboratory and gastroscopic tests to obtain basal data. Time

En este sentido, las lesiones ulcerativas en la mucosa no glandular se relacionan directamente por la acción ácida y en la mucosa glandular son más frecuentes por causas secundarias a los efectos tóxicos sistémicos y locales de los AINEs, especialmente en caballos medicados con fenilbutazona (FBZ)(8). Los efectos colaterales sistémicos de la FBZ son relacionados con la inhibición inespecífica de la enzima ciclooxigenasa (COX), necesaria para la síntesis de prostaglandinas (PGE₂) y óxido nítrico que favorecen la protección y perfusión normal de la mucosa glandular. Por otro lado, los AINEs (como la FBZ), puede inducir daño directo de las células epiteliales de la mucosa glandular (9).

Factores fisiológicos protectores de la mucosa glandular son la perfusión sanguínea gástrica, producción de bicarbonato gástrico y secreción de moco. Estos factores son principalmente influenciados por la producción local de PGE₂. Sin embargo, las COX₁₋₂ son inhibidas inespecíficamente por AINEs como la FBZ, lo que induce a una disminución de la PGE₂ y posible aparición de úlceras en la mucosa glandular (10).

El aceite de maíz es una importante fuente de ácido linoleico, el cual es un precursor del ácido araquidónico, por lo que tiene la capacidad de aumentar la producción de PGE₂ endógena (10,11). Sin embargo, existe poca información sobre los mecanismos del aceite de maíz en los procesos de reparación de caballos con SUGE y como este podría afectar la concentración de AGV en el jugo gástrico. Por lo tanto, se desarrolló un modelo de ulceración gástrica inducido con FBZ en equinos, para: investigar la influencia de este aceite sobre las concentraciones AGV en el jugo gástrico de caballos con úlceras gástricas inducidas con FBZ, y correlacionar los hallazgos gastroscópicos con las concentraciones de los AGV.

MATERIAL Y METODOS

Animales. Un grupo de 15 equinos sin raza definida (11 hembras no preñadas y 4 machos castrados), con un rango de edad entre 5 y 20 años y peso vivo entre 270 - 465 kg, fueron incluidos. Todos los caballos provenían de un sistema de explotación a pasto. Durante el período de adaptación de dos semanas, los animales fueron desparasitados y vacunados. Los caballos fueron alojados en pesebreras individuales y alimentados con heno de *Coast cross (Cynodon dactylon)*, agua *ad libitum* y suplementados con concentrado comercial con 13% de proteína y administrado dos veces al día en la proporción del 1% del peso vivo.

1 was considered between the 1st day and the 6th day, and included the induction time. Time 2 included the time of evaluation of each treatment (treatment time), which was between the 7th day and the 21st day. This study was performed between May and July of 2012.

Experimental PBZ gastric ulcer induction groups. The 15 horses were randomly allotted into one of three groups, as follows: in group I (control group), the animals only received 20 ml of water *per os* (PO), s.i.d, each 24 hours for 6 days; group II received a single PBZ dose of 13.2 mg/kg diluted in 20 mL water on the 6th day of the start of the experiment; group III was medicated with a PBZ dose of 4.4 mg/kg, PO, s.i.d (always diluted in 20 mL of water) for 5 days and on the 6th day received a final PBZ dose of 13.2 mg/kg, PO, diluted in 20 mL water. This induction protocol was designed to study the phenomena of gastroprotection and gastroadaptation the PBZ in the horse, proposed by Martínez Aranzales et al (12).

Treatment groups. After 6 days of placebo (water) or PBZ gastric ulcer induction, the three groups of horses were treated as follows: group I received 30 mg/kg sucralphate, PO, t.i.d, for 2 weeks; group II received 70 mL/100 kg of body weight corn oil, PO, twice a day, for 2 weeks; group III was treated with 90 mL/100 kg of body weight corn oil, PO, twice a day, for 2 weeks. The volume of corn oil used in each group, were extrapolated from work in the species (10, 13). The variables gender and age were blocked in this experiment.

Gastroscope examination. Gastroscope examination was performed on day 0, day 7 and day 21. After a solid fed fasting period of 12 hours and water deprivation time of 4 hours, the horses were sedated with detomidine (10 µg/kg/IV, Dormiun V, Agener União, Brazil) and a 12 mm -width- and 3 m -long- flexible videoendoscope (PortaScope®, 1800PVS, United State) was introduced into the stomach by nasogastric placement. The lesions observed were recorded and classified according to the scoring system of McAllister et al (14) (Table 1).

Determination of the concentration of VFA in gastric fluid. Prior to each endoscopy evaluation and with the help of a gastroscope, 5 mL gastric fluid (juice) were taken and deposited in glass flasks with 1 mL metaphosphoric acid for later determination of the concentration of the VFA (acetic, propionic, butyric and lactic acids) by gas chromatography (7), through reference equipment Shimadzu (Shimadzu (Gas Chromatograph GC-17^a /auto inyector AOC – 20i Shimadzu).

Diseño del estudio. El diseño experimental fue en bloque completamente al azar y desarrollado en tres tiempos específicos. En el tiempo 0, todos los caballos fueron evaluados por laboratorio clínico y examen gastroscópico para obtener datos basales. El tiempo 1, fue considerado entre el primer y sexto día, y comprendió el período de inducción. El tiempo 2, incluyó el período de evaluación de cada tratamiento (tiempo de tratamiento), el cual comprendió el intervalo entre el séptimo y el 21 día. Este estudio fue realizado entre mayo y julio de 2012.

Grupos de Protocolo de inducción de úlcera gástrica con FBZ. Los 15 animales fueron distribuidos en tres grupos (cinco animales por grupo), de la siguiente manera: En el grupo I (grupo control), los animales recibieron 20 ml de agua vía oral (vo)/s.i.d/cada 24 h por 6 días; grupo II recibió una dosis única de 13.2 mg/kg de FBZ diluida en 20 ml de agua/vo, en el sexto día de iniciar el experimento; grupo III, fueron medicados con FBZ a dosis de 4.4 mg/kg/vo/s.i.d. (siempre diluido en 20 ml de agua), por cinco días y en el sexto día recibieron una dosis final de FBZ a 13.2 mg/kg, vo, diluido en 20 ml de agua. Este protocolo de inducción fue diseñado para otros trabajos en el estudio de los fenómenos de gastroprotección y gastroadaptación a la FBZ en el equino, propuesto por Martínez Aranzales et al (12).

Grupos de tratamiento. Después de seis días de placebo y de FBZ para la inducción de las úlceras en los equinos de cada grupo, todos los grupos fueron tratados por dos semanas de la siguiente forma: Grupo I recibió sucralfato a dosis de 30 mg/kg/vo/tid; grupo II recibió 70 ml/100kg/vo/tid de aceite de maíz y grupo III fue tratado también con aceite de maíz en dosis de 90 ml/100kg/vo/tid; el volumen de aceite de maíz utilizado en cada grupo, fueron extrapolados de trabajos realizados en la especie (10, 13). Las variables de sexo y edad se consideraron como bloques en este experimento.

Evaluación gastroscópica. Valoración por gastroscopia fueron realizadas en los días 0, 7 y 21. Después de un ayuno de sólidos (12-14 horas) y de líquidos (4 horas) y sedación (Detomidina 10 µg/kg/iv, Dormiun V®, Agener União, Brasil), la mucosa gástrica de los equinos fue examinada a través de videoendoscopia flexible (PortaScope®, 1800PVS, United State) de 12 mm de diámetro y de 3 m de longitud, introducido vía nasogástrica. Las lesiones observadas fueron registradas en video y clasificadas según el sistema de McAllister et al (14), (Tabla 1).

Table 1. The scoring system of McAllister et al (14) gastric lesion number and gastric lesion severity.

Number score	Description	Severity score	Description
0	0 lesions	0	No lesion
1	1-2 localized lesions	1	Appears superficial (only the mucosa is missing)
2	3-5 localized lesions	2	Deeper than 1 and includes deeper structures
3	6-10 lesions	3	Multiple lesions and variable severity (1, 2 and/or 4)
4	>10 lesions or diffuse lesions	4	Same as 2 and has an active appearance (active = hyperaemic and/or darkened lesion crater)
		5	Same as 4 plus active haemorrhage or adherent blood clot

Statistical analysis. Data were analyzed with the software SPSS 19.0 (IBM, SPSS Inc, USA). Lilliefors and Bartlett tests were used to assess normality and homoscedasticity in the studied variables. Therefore, data from butyric and acetic acids were transformed to log+4. The Tukey test and t test were used for comparison of means for acetic and butyric acid, respectively. Data from propionic and lactic acids did not present a normal distribution even after attempting several transformations. These data were compared by Friedman and Kruskal-Wallis tests. $P < 0.05$ was considered statically significant for all the tests. The calculated power of this study was 0.8 (80%) using a sample size of 5 horses for experimental group and alpha error level of 5%.

This experimental study was approved by the local ethical committee for animal experimentation of the University Federal of Minas Gerais - Brazil, with protocol number 234/09. The study was conducted at the School of Veterinary Medicine at the University of Minas Gerais in Belo Horizonte, Brazil, located at latitude 19°55' S and longitude 43°56' W Gr, and an altitude of 832 m with kind of climate Cwa (according to Köpper classification), featuring winter predominantly dry summer rainy, according to the National Institute of Meteorology of Brazil.

RESULTS

All horses finished the period of the study without manifesting any clinical sign or metabolic alteration related to systemic illness.

Gastroscopy findings. At first gastroscopy assessment (zero day) no injuries were reported. Later on day seven post-induction, it was found that the protocol based in PBZ and even the effect

Determinación de la concentración de AGV en fluido gástrico.

Antes de cada gastroscopia y con la ayuda del endoscopio fueron recolectados 5 ml de fluido gástrico y depositados en recipiente de vidrio con 1 ml de ácido metafosfórico para medir posteriormente la concentración de AGV (acético, propiónico, butírico y láctico) por cromatografía de gases (7), a través de equipo de la referencia Shimadzu (Gas Chromatograph GC-17^a /auto inyector AOC - 20i Shimadzu).

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados con el software SPSS 19.0 (IBM, SPSS Inc, USA). Se realizaron los test de Lilliefors y Barlett para evaluar normalidad y homocedasticidad en las variables estudiadas. Los datos del ácido butírico y alético fueron transformados a log+4. Los test de Tukey y t fueron utilizados para la comparación de medias para el ácido acético y butírico respectivamente. El ácido propiónico no presentó las características evaluadas y junto al ácido láctico, las medianas fueron comparadas por los test de Friedman y Kruskal-Wallis. Un $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo para todos los test. El poder calculado para este estudio fue de 0.8 (80%), usando un tamaño de muestra de cinco caballos por grupo experimental y un error alfa del 5%.

Este estudio experimental fue aprobado por el comité de ética para la experimentación animal de la Universidad Federal de Minas Gerais - Brasil, con el protocolo número 234/09. El trabajo se desarrolló en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Federal de Minas Gerais, en Belo Horizonte, Brasil; localizada en la latitud 19°55' S y longitud 43°56' W Gr; y una altitud de 832 m, con un clima tipo Cwa (según la clasificación de Köpper), caracterizado por un invierno predominantemente seco y un verano lluvioso, según el Instituto Nacional de Meteorología de Brasil.

RESULTADOS

Todos los animales finalizaron el período de estudio sin manifestación de signos clínicos o de alteración metabólica relacionada con enfermedad sistémica.

Hallazgos gastroscópicos. En La primera evaluación gastroscópica (día cero) no se reportaron lesiones. Posteriormente en el día siete postinducción, se pudo constatar que el protocolo a base de FBZ y el efecto del confinamiento ocasionaron lesiones en ambas mucosas del estómago. En general, las lesiones encontradas se clasificaron según McAllister et al (14) en el rango de 1 a 3 tanto en número

of confinement produced lesions in the both non-glandular and glandular areas of the stomach. In general, these lesions presented a McAllister et al (14) degree for number and severity ranging from 1 to 3. Finally, at day 21 post-treatment it was found that all treatments (corn oil at two doses and sucralphate) produced healing of the injured the glandular area of the gastric mucosa. However, neither of the two corn oil treatments affected healing of the gastric ulcers located in the non-glandular area. Therefore, once the completed experimental phase, these animals were treated with proton-pump inhibitor (antacid) in traditional scheme for full recovery.

VFA concentrations in gastric fluid. The concentrations of VFA determined in the gastric contents in the two experimental phases are presented in tables 2 and 3. The concentrations of acetic and butyric acids were highest in the gastric juice (2.32-3.80 and 1.64-2.39 mmol/L, respectively), where butyric acid represented most of the total concentration of VFA (Table 2). Propionic and lactic acids were present in lower concentrations (0.0015-0.12 and 0.05-0.61 mmol/L, respectively).

Table 2. Means (\pm standard deviations) of the concentration of acetic acid and butyric acid in gastric contents of the horses of the study over a period of 21 days.

Variable	Group	Induction		Treatment	
		Day 0	Day7	Day14	Day21
Acetic acid (mmol/L)	I	3.80 \pm 1.27	2.82 \pm 0.04	2.92 \pm 0.10	2.32 \pm 0.01
	II	3.20 \pm 0.09	2.79 \pm 0.05	3.04 \pm 0.02	2.39 \pm 0.01
	III	3.44 \pm 0.70	2.85 \pm 0.05	2.72 \pm 0.04	2.46 \pm 0.02
Butyric acid (mmol/L)	I	2.39 \pm 0.04	2.00 \pm 0.01	1.86 \pm 0.01	1.83 \pm 0.01
	II	1.61 \pm 0.02	2.12 \pm 0.01	1.88 \pm 0.01	1.83 \pm 0.02
	III	1.98 \pm 0.02	1.70 \pm 0.01	1.64 \pm 0.01	1.76 \pm 0.01

The baseline concentration (t0) of propionic acid showed significant differences between groups I and II. In the treatment phase, propionic acid concentration was significantly different in group II, between the second and third weeks. In the same phase, lactic acid concentration of group III was significantly different between the first and third weeks (Table 3). When the two experimental phases were compared, the concentration of propionic acid in group I showed a significant difference between the baseline and the final measurement. The same was also observed for lactic acid in groups II and III during the same period of time. Butyric and acetic acids did not present significant alterations in any groups and period of time evaluated during the study (Table 2).

como en severidad. Finalmente, al día 21 postratamiento se pudo constatar que todos los tratamientos (aceite de maíz en las dos dosis y sucralfato), cicatrizaron las lesiones del área glandular de la mucosa gástrica. Sin embargo, ninguno de los dos tratamientos a base de aceite de maíz reparó las úlceras gástricas ubicadas en el área no glandular. Por tanto, una vez finalizada la fase experimental, estos animales fueron tratados con inhibidores de la bomba de protones (antiácido) en esquema tradicional para su recuperación total.

Concentraciones de AGV en el fluido gástrico.

Las concentraciones de AGV determinadas en el contenido gástrico en las dos fases experimentales se describen en la tabla 2 y 3. La concentración de los ácidos acético y butírico fueron las más abundantes en el jugo gástrico (2.32-3.80 y 1.64-2.39 mmol/L respectivamente), donde el ácido butírico representó la mayor parte de la concentración total (Tabla 2). Los ácidos propiónico y láctico presentaron menor concentración (0.0015-0.12 y 0.05-0.61 mmol/L respectivamente).

Las concentraciones basales o iniciales (Semana 0) del ácido propiónico presentaron diferencias significativas entre los grupos I y II. En la fase de tratamientos, la concentración del ácido propiónico fue significativamente diferente en el grupo II entre la segunda y tercera semana. En la misma fase, la concentración del ácido láctico del grupo II tuvo diferencia significativa entre la primera y tercera semana (Tabla 3). Comparando las dos fases experimentales, la concentración del ácido propiónico en el grupo I mostró diferencia significativa entre el valor basal y el período final; igualmente la concentración del ácido láctico de los grupos II y III en los mismos periodos. El butírico y el acético no presentaron alteraciones significativas en todos los grupos y periodos evaluados durante el estudio (Tabla 2).

DISCUSIÓN

El SUGE se caracteriza por la convergencia de varios factores predisponentes que contribuyen a las elevadas frecuencias de presentación de esta patología en el caballo. Igualmente, se conoce la susceptibilidad de cada una de las áreas de la mucosa del estómago; en el caso de los AINEs y eventos que generan estrés como el confinamiento, son comúnmente relacionados con estas lesiones (15). Estos dos factores fueron considerados en el presente estudio para inducir ulceración gástrica en los caballos estudiados. El protocolo empleado en este estudio, generó úlceras en ambas mucosas

Table 3. Medians (ranges) of the concentration of propionic acid and lactic acid in gastric contents of the horses of the study during 4 weeks.

Variable	Group	Induction		Treatment	
		Day 0	Day7	Day14	Day21
Propionic acid (mmol/L)*	I	0.12(0.02-0.31)aA	0.02(0.01-0.05)ab	0.02(0.01-0.05)ab	0.0015(0-0.01)b
	II	0.01(0.01-0.05)abB	0.02(0.01-0.02)ab	0.03(0.01-0.05)a	0.1(0-0.01)b
	III	0.07(0.08-0.22)AB	0.01(0.0010-0.05)	0.012(0.01-0.13)	0.01(0-0.041)
Lactic acid (mmol/L)*	I	0.08(0.05-0.28)	0.05 (0.03-0.06)	0.06 (0.43-0.09)	0.05 (0.04-2.02)
	II	0.04(0.03-0.06)b	0.61(0.01-0.12)ab	0.07(0.06-0.09)ab	0.10(0.06-0.13)a
	III	0.08(0.02-0.40)a	0.05(0.03-0.06)a	0.10(0.06-0.27)ab	0.07(0.06-0.104)b

*Medians followed by different lowercase letters represent significant differences in same row ($p < 0.05$). Medians followed by different capital letters represent significant differences in the same column ($p < 0.05$).

DISCUSSION

EGUS is characterized by several predisposing factors that contribute to the high frequency of presentation of this gastric pathology in horses. Furthermore, the susceptibility of each of the areas of the stomach zones is also known. Gastric lesions are produced in horses by the action of NSAID and by situations with potential for generating stress, like confinement (15)c. These two factors were considered in the present study for inducing gastric ulceration in the horses included. The protocol used in the present study generated ulcers in both, glandular and non-glandular mucosa. This situation allowed evaluation of the dynamics of the concentrations of the VFA under the effect of PBZ and participation of VFA in the healing of lesions during the administration of corn oil and sucralphate.

Horses in this study presented an absence of clinical signs and changes in their haemogram and biochemistry panel. These findings may be because these horses developed mild gastric ulcers with lower scores in number and severity(14). However, the severity of an ulcer is not always correlated with the intensity of the clinical signs (16). This situation prevents determination of the clinical relevance of the degree of ulceration in some equine patients (15,17). It is also important to consider the participation of the continued supply of food in maintaining gastric pH gradient, which results in temporary relief with little expression of clinical signs.

Total VFA concentration in the gastric contents of the horses in this study was higher compared with the concentration reported by Frank et al (13). In that study, corn oil and rice oil were added preventively to diminish gastric lesions associated with feed management. However, total VFA concentration of the present study was lower than those reported for diets based on concentrate and alfalfa hay (7). However, it is necessary to consider the nature of the present study, since the dynamics of VFA concentrations were measured in the presence of experimentally induced ulcers.

de la superficie gástrica. Situación que permitió evaluar la dinámica de las concentraciones de AGV por efecto de la FBZ y la participación de los AGV en la resolución de las lesiones durante la administración de aceite de maíz y sucralfato.

Los caballos de este estudio no presentaron signos clínicos y alteraciones en las variables del hemograma y de la bioquímica sanguínea. Estos hallazgos se debieron posiblemente al desarrollo de leves ulceraciones gástricas y con baja clasificación tanto en número como en severidad (14). Sin embargo, la severidad de una úlcera no siempre se relaciona con la intensidad de los signos clínicos (16). Lo que dificultaría determinar la relevancia clínica de los grados de ulceración en algunos pacientes (15, 17). Además, es importante considerar la participación de la oferta continua de alimento en el mantenimiento del gradiente del pH gástrico, que se traduce en alivio transitorio con poca expresión de signos clínicos.

La concentración total de AGV en el contenido gástrico de los equinos de este trabajo, fue mayor a la reportada por Frank et al (13); en este estudio utilizaron preventivamente el aceite de maíz y de arroz para lesiones causadas por manejo alimentar. Sin embargo, la concentración de AGV en este trabajo, fue menor a la reportada en dietas a base de concentrado y heno de alfalfa (7). No obstante, se debe considerar la naturaleza del presente estudio, una vez que se valoró el comportamiento de los AGV en presencia de úlceras.

Las diferencias en estos resultados pueden derivarse de varios factores que se deben considerar para su interpretación. Fisiológicamente, la concentración de AGV disminuye acentuadamente cinco horas después de cada comida (18). En este estudio las toma de muestras fueron realizadas después de 12-14 horas de ayuno. Por otro lado, es posible

The differences found in the results of this study may derive from several factors that should be considered for their interpretation. In physiological conditions, the VFA concentration decreases markedly five hours after each meal (18). In the present study, sampling was performed after 12-14 hours of fasting. However, it is possible that the water restriction period was not enough to avoid its diluting effect on the gastric VFA concentration of the horses. On the other hand, the production of VFA is dependent on the type, quality, and quantity of food (7). This last factor varies widely in the different research studies. Furthermore, the bacterial flora adapted to the gastric environment is also involved in the fermentation processes; consequently, it may affect the VFA concentration (19).

Furthermore, it is likely that the total VFA concentration had also been changed by volatilization processes prior to the collection or by transformation to carbon dioxide, β -hydroxybutyrate, and acetoacetate, which normally occur with these acids (5). In addition, the animals in this study were fed a diet low in fermentable carbohydrates (approximately 2.5 kg of concentrated and distributed on average twice/day), unlike other studies where these types of carbohydrates were used (13).

Although, in the gastric ulcer induction period of this study no significant differences in the VFA concentrations were observed between the groups of horses, the VFA data showed slight alterations. However, as shown in the control group, the effect of confinement may have had a greater action on the gastric ulceration in the horses than PBZ. However, it is also necessary to consider that VFA have ulcerogenic effects in the equine stomach (5, 7) and are altered in horses with right dorsal colitis induced by PBZ (20).

In vitro studies employing the Ussing chamber demonstrated the great ulcerogenic capacity of VFA. In this *in vitro* system, the concentration of each specific VFA is maintained in a constant fashion in the mucosa of the stomach (5, 6). However, this procedure excludes other natural components of the gastric environment that are involved in some way in its gastrolesive action. In contrast, an *in vivo* model includes all the components from the natural stomach environment, such as the motility, gastroduodenal reflux, interdigestive or basal condition, fluctuations in hydrochloric acid and gastric flora, amongst others, all of importance in the pathophysiology of EGUS. However, as in this study, some variables are characterized as being complicated to control or quantify.

The ulcerogenic effect of VFA depends on the pH in the gastric lumen. Specifically, at a pH lower than 4, VFA accentuate the alterations in the non-glandular mucosa area of the equine stomach, specifically

que el período de restricción de agua antes de las gastroscopias, no fue suficiente para evitar el efecto diluyente. Además, la producción de AGV depende del tipo, calidad y cantidad de la alimentación (7), factor que varía ampliamente entre los trabajos realizados. Además, de la flora gástrica adaptada que participa en los procesos fermentativos también puede afectar la concentración de los AGV (19).

Por otro lado, es probable que la concentración AGV total encontrada, también haya sufrido modificación por procesos de volatilización antes de la colección o de transformación a dióxido de carbono, β -hidroxibutirato o acetoacetato que normalmente ocurren con estos ácidos (5). Adicionalmente, los animales de este estudio fueron alimentados con una dieta baja en carbohidratos fermentables (aproximadamente 2.5kg de concentrado en promedio y distribuido dos veces/día) a diferencia de otros trabajos (13).

A pesar de no reportarse diferencias significativas en las concentraciones de AGV entre los grupos en el período de inducción, los datos reflejaron leves alteraciones; no obstante, las reacciones derivadas del efecto del confinamiento posiblemente tuvieron participación en la generación de ulceraciones, tal como se evidencia en el grupo control que no recibieron FBZ en la inducción. Sin embargo, efectos ulcerogénicos importantes en el estómago por AGV (5, 7) y cambios en la producción de AGV en la colitis dorsal derecha inducida con FBZ en equinos se han reportado contundentemente (20).

Estudios "*in vitro*" con cámara de Ussing, demostraron el grado ulcerogénico de los principales AGV. En estas condiciones se expone una concentración conocida y constante de cada AGV a la mucosa del estómago (5, 6); pero se excluye un ambiente gástrico natural que de cierta manera participa en la acción gastrolesiva. En contraste, un estudio "*in vivo*", engloba otros componentes como la motilidad, reflujo gastroduodenal, la condición interdigestiva o basal, fluctuaciones del ácido clorhídrico y flora gástrica, de importancia en la fisiopatología del SUGE. Sin embargo, como en este estudio, algunas variables se caracterizan por ser complejas de controlar o cuantificar.

La participación de los AGV en el desarrollo de las úlceras depende del pH en el lumen gástrico. Específicamente en pH <4 estos ácidos acentúan las alteraciones en la área no glandular de la mucosa, específicamente en el área adyacente al *margo plicatus* en

in the area adjacent to the *margo plicatus* the lesser curvature (5, 6). In the present study, the perpetuating injuries focused in the non-glandular mucosa area were possibly derived due to the no ionization of the VFA assed (acetic, propionic and butyric acids) and, the low pH of gastric contents (2.38-3.77) in the groups treated with corn oil, which the ulcers did not completely heal.

It is know that VFA modify the bioelectric properties of the gastric mucosa by decreasing sodium transport. This results in different levels of change in the cell membrane permeability, according to the type of acid (5, 6, 21). Acetic acid showed the highest concentration (59%) in the gastric contents of the horses of this study. This result is similar to that of other studies (5, 6, 7), but it has been reported that in horses treated with corn and rice oils, this VFA may reach up to 85% of gastric contents (13). However, acetic acid causes discrete lesions in the gastric mucosa.

Contrary to what was reported by Frank et al (13), the gastric contents of this study showed butyric acid concentrations of 40%. "*In vitro*" studies have shown that butyric acid has a more damaging effect on the non-glandular mucosa area (5). The higher butyric acid concentrations reported in this study may be related to the extensive ulceration observed in the non-glandular mucosa area of the horses in this study.

Propionic acid has a moderate gastrolesive effect (5). However, the concentration of this VFA in the gastric juices evaluated was lower (0.0015-0.12 mmol/L) than those reported in the literature. Therefore, the ulcerogenic role of propionic acid was possibly minimal in the animals in this study. The differences in the concentration of propionic acid between different studies are possibly associated with the aforementioned factors, such as feed manipulation and prolonged fasting periods.

There are several studies that describe abundant production of lactic acid in the equine stomach (19), especially immediately after consumption of food (18). In contrast, the concentrations of lactic acid reported in the present study were lower in comparison with those of other studies. The fasting time and type and feeding scheme may have influenced these results. *In vitro studies* have demonstrated that VFA has minimal ulcerogenic capacity in the non-glandular mucosa of the horse (21). The effect of lactic acid is dependent on the amount and time of exposure to the mucosa; therefore, it is possible to infer that this VFA plays a poor role in the generation of gastric ulcers in the horses of this study.

la curvatura menor (5, 6). En este trabajo, posiblemente la perpetuación de las lesiones en la área no glandular de la mucosa fueron derivadas de la no ionización de los AGV analizados (acético, butírico y propiónico), por el pH bajo del contenido gástrico que osciló entre 2.38 y 3.77 en los grupos tratados con aceite de maíz, donde no cicatrizaron las úlceras en su totalidad.

Los AGV modifican las propiedades bioeléctricas de la mucosa al disminuir el transporte de sodio, lo que ocasiona diferentes niveles de alteración en la permeabilidad según el tipo de ácido (5, 6, 21). El ácido acético presentó la mayor concentración (59%) en el contenido gástrico, dato similar a otros estudios (5, 6, 7), y menor que 85% determinado en caballos tratados también con aceite de maíz y de arroz (13). Sin embargo, este ácido causa lesiones discretas a la mucosa gástrica.

Contrario a lo reportado por Frank et al (13), el ácido butírico en los animales de este estudio, presentó concentraciones de 40%. Estudios "*in vitro*" demostraron un mayor efecto lesivo del ácido butírico sobre el área no glandular de la mucosa (5). Por las condiciones presentadas, posiblemente el ácido butírico tuvo amplia participación en las ulceraciones presentes en esta área de la mucosa de los caballos del presente trabajo.

El ácido propiónico tuvo un moderado efecto gastrolesivo (5). Sin embargo, en los jugos gástricos evaluados, su concentración (0.0015-0.12 mmol/L) fue menor a las reportadas en la literatura; por consiguiente la participación ulcerogénica fue mínima en estos animales de este estudio. Las diferencias en la concentración entre los trabajos, posiblemente obedece a los factores descritos anteriormente, es decir manejo alimentario y el prolongado periodo de ayuno.

Con respecto al ácido láctico, trabajos describen abundante producción en el estómago del equino (19), en especial inmediatamente después del consumo del alimento (18). En contraste, las concentraciones del ácido láctico halladas fueron mínimas a las reportadas, tal vez el período de ayuno y el tipo y esquema de alimentación influyeron en estos resultados. El poder ulcerogénico también es mínimo en la mucosa no glandular según estudios "*in vitro*" (21), siendo su efecto relacionado con la cantidad y el tiempo de exposición a la mucosa; por consiguiente, se puede inferir una baja participación en la presencia de las úlceras en este trabajo.

In conclusion, the corn oil and sucralphate treatments did not lead to differences in the concentration of acetic acid and butyric acid in this study. In contrast, these treatments produced different gastric juice concentrations of propionic acid and lactic acid. However, the small quantity and proportion of these VFA with respect to acetic acid and butyric acid, let us to think that propionic acid and lactic acid were no relevant VFA during the induction and treatment periods in the horses of this study. Conversely, the gastric acids with the highest concentrations, in particular butyric acid, possibly perpetuated the lesions in the non-glandular mucosa area, where the corn oil showed no therapeutic benefit. These results verify the harmful effect of some AGV on non-glandular mucosa, however it should be considered restorative action through induction of prostaglandins per treatment in the glandular mucosa.

Finally, VFA must be continuously measured over short periods of time to eliminate the effect of volatility and metabolic transformations of these substances in the equine gastric environment. Furthermore, it is necessary to bear in mind the dynamics of the phases of emptying of the stomach to reduce their impact on the results and to effectively compare new results with reported "in vitro" studies.

Acknowledgments

The authors thank people from the laboratory of animal nutrition from the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. This research was granted by CNPq, CAPES-PG, UFMG, Brazil, and sustainability project 2013-2014 from CODI - Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

En conclusión, los tratamientos a base de aceite de maíz fueron similares al instaurado con sucralfato con relación a la concentración de los ácidos acético y butírico, pero con comportamiento diferente con el ácido propiónico y láctico, no obstante, estos últimos por encontrarse en pequeñas proporciones no se consideraron de relevancia tanto en la inducción como en los tratamientos. Los ácidos en mayores concentraciones en especial el butírico al parecer perpetuó la lesión en el área no glandular de la mucosa, donde el aceite de maíz no mostró beneficios terapéuticos. Estos resultados comprobaron el efecto nocivo de algunos AGV sobre la mucosa no glandular; sin embargo, se debe considerar el efecto recuperador a través de la inducción de prostaglandinas por cada tratamiento en la mucosa glandular.

Finalmente, los AGV deben ser medidos continuamente y en períodos de tiempo cortos para eliminar el efecto de la volatilidad, transformaciones metabólicas en el ambiente gástrico y las dinámicas de las fases de vaciamiento del estómago para disminuir el impacto en los resultados y poder comparar efectivamente con lo reportado en estudios "in vitro".

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal del laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil. Esta investigación fue concedida por el CNPq, CAPES-PG, UFMG, Brasil, y el proyecto de sostenibilidad 2013-2014 de CODI - Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

REFERENCES

1. Hepburn R. Equine practice: Gastric ulceration in horses. In Practice 2011; 33(3):116-24.
2. Videla R, Andrews FM. New perspectives in equine gastric ulcer syndrome. Vet Clin North Am Equine Pract 2009; 25(2):283-301.
3. Malmkvist J, Poulsen JM, Luthersson N, Palme R, Christensen JW, Søndergaard E. Behaviour and stress responses in horses with gastric ulceration. Appl Anim Behav Sci 2012; 142(3-4):160-7.
4. Husted L, Sanchez LC, Olsen SN, Baptiste KE, Merritt AM. Effect of paddock vs. stall housing on 24 hour gastric pH within the proximal and ventral equine stomach. Equine Vet J 2008; 40(4):337-41.
5. Nadeau JA, Andrews FM, Patton CS, Argenzio RA, Mathew AG, Saxton AM. Effects of hydrochloric, acetic, butyric, and propionic acids on pathogenesis of ulcers in the nonglandular portion of the stomach of horses. Am J Vet Res 2003; 64(4):404-12.

6. Nadeau JA, Andrews FM, Patton CS, Argenzio RA, Mathew AG, Saxton AM. Effects of hydrochloric, valeric and other volatile fatty acids on pathogenesis of ulcers in the nonglandular portion of the stomach of horses. *Am J Vet Res* 2003; 64(4):413-7.
7. Nadeau JA, Andrews FM, Mathew AG, Argenzio RA, Blackford JT, Sohtell M, *et al.* Evaluation of diet as a cause of gastric ulcers in horses. *Am J Vet Res* 2000; 61(7):784-90.
8. Soma LR, Uboh CE, Maylin GM. The use of phenylbutazone in the horse. *J Vet Pharmacol Ther* 2011; 35:1-12.
9. Cook LV, Blikslager AT. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in critically ill horses. *J Vet Emerg Crit Care* 2015; 25(1):76-88.
10. Cargile JL, Burrow JA, Kim I, Cohen ND, Merritt AM. Effect of dietary corn oil supplementation on equine gastric fluid acid, sodium, and prostaglandin E2 content before and during pentagastrin infusion. *J Vet Intern Med* 2005; 18(4):545-9.
11. Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Halici M, Aygun H, Suleyman H, *et al.* Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and α -tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 591(1-3):300-6.
12. Martinez Aranzales JR, Candido de Andrade BS, Silveira Alves GE. Orally administered phenylbutazone causes oxidative stress in the equine gastric mucosa. *J Vet Pharmacol Therap* 2014; 38(3):257-264.
13. Frank N, Andrews FM, Elliott SB, Lew J. Effects of dietary oils on the development of gastric ulcers in mares. *Am J Vet Res* 2005; 66(11):2006-11.
14. McAllister CG, Andrews FM, Deegan E, Ruoff W, Olovson SG. A scoring system for gastric ulcers in the horse. *Equine Vet J* 1997; 29(6):430-3.
15. Luthersson N, Nielsen KH, Harris P, Parkin TDH. Risk factors associated with equine gastric ulceration syndrome (EGUS) in 201 horses in Denmark. *Equine Vet J* 2009; 41(7):625-30.
16. Murray MJ, Grodinsky C, Anderson CW, Radue PF, Schmidt GR. Gastric ulcers in horses: a comparison of endoscopic findings in horses with and without clinical signs. *Equine Vet J Suppl* 1989; 7:68-72.
17. Le Jeune SS, Nieto JE, Dechant JE, Snyder JR. Prevalence of gastric ulcers in Thoroughbred broodmares in pasture: A preliminary report. *Vet J* 2009; 181(3):251-5.
18. Varloud M, Fonty G, Roussel A, Guyonvarch A, Julliard V. Postprandial kinetics of some biotic and abiotic characteristics of the gastric ecosystem of horses fed a pelleted concentrate meal. *J Anim Sci* 2007; 85(10):2508-16.
19. Al Jassim RAM, Andrews FM. The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2009; 25(2):199-215.
20. McConnico RS, Morgan TW, Williams CC, Hubert JD, Moore RM. Pathophysiologic effects of phenylbutazone on the right dorsal colon in horses. *Am J Vet Res* 2008; 69(11):1496-505.
21. Andrews FM, Buchanan BR, Elliott SB, Al Jassim RAM, McGowan CM, Saxton AM. In vitro effects of hydrochloric and lactic acids on bioelectric properties of equine gastric squamous mucosa. *Equine Vet J* 2008; 40(4):301-5.