

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, APOPTOSE E  
EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES NO TECIDO  
LAMINAR DE EQUINOS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO  
INTESTINAL EXPERIMENTAL. EFEITOS DA  
HIDROCORTISONA**

**Luciane Maria Laskoski**

Médica Veterinária

**JABOTICABAL- SP**

**2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, APOPTOSE E  
EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES NO TECIDO  
LAMINAR DE EQUINOS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO  
INTESTINAL EXPERIMENTAL. EFEITOS DA  
HIDROCORTISONA**

**Luciane Maria Laskoski**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária junto ao programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária.

**JABOTICABAL- SP**

**2009**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LUCIANE MARIA LASKOSKI** – nasceu na cidade de Curitiba, PR, no dia 18 de abril de 1981, filha de João Laskoski e Leonor Madalena Laskoski. Em janeiro de 2005, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná, Campus de Curitiba. Participou como aprimoranda do Programa de Aprimoramento (Residência) em Medicina Veterinária na área de Clínica Médica de Grandes Animais, nos anos de 2005 e 2006, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp, câmpus de Jaboticabal, e, em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, no curso de Mestrado.

*"Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e a outra é pensar que tudo é um milagre."*

*Albert Einstein*

*A todos os eqüinos que já passaram pela minha vida, sobretudo os animais utilizados neste estudo.*

*Ao meu irmãozinho Tiago (in memoriam), que sempre cultivou o verdadeiro amor aos cavalos. Agradeço a Deus, por todos os anos, meses e horas que viveu conosco. Todas as minhas conquistas são também suas conquistas.*

Dedico

*Aos meus tesouros*

*Meu pai, João Laskoski, exemplo extraordinário de ser humano, dotado de imensa capacidade de amar ao próximo, em quem procuro me espelhar todos os dias. Agradeço a Deus por todos os momentos que me permite desfrutar de sua presença!*

*À minha mãe, Leonor Madalena Laskoski, que sempre se dedicou a todos com muito amor e carinho. E mesmo em meio a obstáculos, por vezes tão dolorosos, não se deixou abater, sendo a rocha sólida que une a nossa família.*

*Às minhas queridas irmãzinhas, Renata e Lorena, que muito mais que irmãs, são minhas melhores amigas, a quem tudo confio. Não são apenas os laços de sangue que nos unem...somos irmãos de alma!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que sempre esteve ao meu lado, não permitindo que eu duvidasse um segundo sequer sobre sua existência, mesmo nos momentos mais difíceis e dolorosos dessa caminhada, chamada vida.

Ao prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, profissional a quem já admirava antes de conhecer, por ter me aceitado como sua orientada, propiciando conhecimento ímpar durante o mestrado. Com o senhor aprendi que os sonhos são importantes para guiar nossos passos em direção ao futuro, mas que não se deve desprezar as várias etapas, e concluí-las da melhor forma possível. E agora, como não haveria de ser, pelo senhor sinto um profundo respeito e carinho, por tudo o que tem feito em relação a mim.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, pela co-orientação de grande importância durante a realização deste trabalho, me inserindo no mundo “tenebroso” da imunohistoquímica. Co-orientação esta que me possibilitou conviver com a pessoa querida Rosemeri, sempre disposta a ajudar a todos que lhe procuram com extrema amabilidade.

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia Aplicada da Prof<sup>a</sup>. Dagmar Machado, da UNICAMP, especialmente à Juliete e Danilo, pela pronta solicitação que foi fundamental para os resultados finais deste estudo.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, Téo, Edgar, Lia, Francisca e Ronaldo, que foram de extrema importância para a execução experimental, auxiliando nas coletas do material, preparação das lâminas e

armazenagem das amostras A dedicação, boa vontade e amizade de todos vocês foi muito importante para o desenrolar deste estudo.

À Adriana Helena de Souza, que me orientou, com muita propriedade, a dar os passos iniciais na pesquisa com laminite.

À Nathalia dos Santos Costa, e também a seu orientador Prof. José Jurandir Fagliari, pelo trabalho em parceria que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao prof. Dr. Antônio Carlos Alessi, pela utilização de seu laboratório e contribuições inteligentes e construtivas sobre este trabalho. Saiba que lhe admiro e estimo pela pessoa diferenciada que é, como profissional ético e dotado de conhecimento, e pessoa querida e agradável. Poder trabalhar junto ao senhor foi uma oportunidade única que este trabalho me proporcionou.

Ao prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto, pelas valorosas contribuições a esse trabalho. Aproveito para destacar, que agradeço não apenas pelo momento atual, mas principalmente por todo o aprendizado que tive graças aos seus ensinamentos durante a residência, e mesmo durante o mestrado. Pelo senhor tenho, além de admiração, um carinho sincero.

Ao colega Alexandre Pinto Ribeiro, pela boa vontade em cooperar, sendo de fundamental importância para que as análises zimográficas pudessem ser realizadas

À funcionária da reprodução, Roberta, pela boa vontade em me ajudar com o congelamento das amostras.

À Ana Carolina Trompieri, pela pronta colaboração com a técnica de imunohistoquímica e amizade durante todo o tempo de realização da IHQ.

À Geórgia Mode, por toda a doçura e boa vontade em me ajudar com a leitura das lâminas.

Ao prof. Dr. Rafael Resende Faleiros, pelas valiosas trocas de informações que resultaram neste trabalho. Profissional a quem admiro, pelo imenso conhecimento e simplicidade.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renee Laufer Amorim, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Botucatu, por toda a ajuda durante a padronização da imunohistoquímica para caspase 3.

Ao amigo Marsel de Carvalho, pela fundamental ajuda na colheita de material no abatedouro de eqüinos, e por todo o companheirismo durante o tempo de mestrado.

À querida amiga Andréa Uribe, grande companheira nestes dois anos de mestrado. Pude contar com sua ajuda durante a coleta de casco dos animais controle e inúmeras outras atividades, de boa vontade e entusiasmo. Obrigada por todo o carinho e palavras sempre ditas no momento exato. Você é muito especial para mim.

Ao Dr. Philip Johnson, contribuindo com conhecimento ímpar a respeito de diversos aspectos nesse trabalho, sempre com extrema amabilidade e atenção.

À Rodrigo Norberto Pereira, pelo companheirismo durante o período experimental, muito importante para superar todas as dificuldades que se apresentaram

Ao funcionário Cláudio, responsável pelo transporte da Unesp, pela boa vontade em ajudar com todas as atividades que dependiam de sua colaboração.

À Fapesp, pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado e auxílio pesquisa, sem os quais seria impossível desenvolver este estudo.

Aos professores José Jurandir Fagliari, Mario Roberto Hatayde, Luis Carlos Marques e Luis Fernando O. S. Carvalho pelo período de grandes ensinamentos durante a residência. Agradeço também aos professores José Wanderley Cattelan, Delhim da Graça Macoris, José Antônio Marques e Júlio Carlos Canola pelas contribuições importantes no mesmo período.

Às funcionárias da Pós-graduação, em especial a Karina, Márcia e Bel por toda a ajuda e boa vontade em colaborar com os trâmites burocráticos.

Aos funcionários do HV, Edson, Zé Buzoli, Carlão, José, Bertanha, Carlos, Arildo, Arnildo e Laerte por toda a ajuda e amizade durante a residência e em vários momentos durante o mestrado. Agradeço muito também as queridas funcionárias da diretoria, Sirlene e Dalva, pela boa vontade em me ajudar em tudo o que pudessem. À Shizuko e Alécio, por todos os auxílios burocráticos prestados. Agradeço aos demais, Ana, Izilda, Márcia, Luiza, Flávia, Lígia, Miguel, Lidiane, pelo convívio tranquilo e prazeroso durante todo esse tempo. E, de modo especial, ao Eugênio, pela paciência e disposição para fotografar os cortes histológicos.

Às queridas amigas que fiz em Jaboticabal: Fernanda Perez Medeiros, Thaís Gomes Rocha e Larissa Gabriela Ávila, que durante um ano de intensa convivência tornaram minha vida em Jaboticabal muito mais leve e feliz. À Dunia Trujillo, minha amiga colombiana, companheira dos meses finais do mestrado. À Julia Eumira, que mesmo encontrando poucas vezes, compartilhamos uma amizade rara. À Sabrina Santos Costa, amiga desde os tempos de estágio, de coragem e determinação contagiantes. Todas mulheres guerreiras, honestas e verdadeiras, vocês são os meus presentes de Deus em Jaboticabal.

À amiga Marina Mendes, pela amizade espontânea. O seu jeito de ser, determinado, e seu amor aos animais, me servem de exemplo.

Às minhas amigas, Camila Gomes, Márcia Albuquerque e Anabella Mira, amigadas que o tempo não apaga e a distância não diminui. Sempre presentes em todos os grandes momentos da minha vida, sejam eles alegres ou tristes.

Deixo aqui também registradas, algumas palavras que a emoção não permitiu dizer pessoalmente...o agradecimento especial à meus pais e minhas irmãs. À vocês, que foram a rocha forte que sustentou toda a minha caminhada em busca de meus sonhos, com a certeza, como vocês mesmos falaram, que se algo desse errado estariam sempre esperando por mim. Por vocês levanto a cada tropeço da vida, e é para vocês que ofereço todas as conquistas de meu esforço. Tenho muito orgulho de nossa origem e nossa história. Nesta família aprendi o sentido da palavra amor.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Animais.....	11
4.1.1 Animais Controle Normais (Gc).....	11
4.1.2 Animais Submetidos a Procedimento Cirúrgico (Gi, Gt e Gnt).....	12
4.2 Delineamento Experimental.....	12
4.2.1 Distribuição dos grupos.....	13
4.2.2 Extração do tecido laminar.....	14
4.3 Análise em Microscopia de Luz.....	14
4.4 Análise Imunohistoquímica (IHQ) para Detecção de Caspase 3 e 4 e Metaloproteinases (MMPs) 2 e 9.....	15
4.5 Análise Zimográfica das MMPs 2 e 9.....	17
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
6. RESULTADOS.....	18
6.1 Presença de Lesões Histológicas no Córium laminar.....	19
6.2 Imunomarcação para Caspase 3 e 14.....	23

6.3 Intensidade de Imunomarcção para MMP-2.....	26
6.4 Intensidade de Imunomarcção para MMP-9.....	28
6.5 Relação de Dependência entre os Escores de Alteração Morfológica e Intensidade de Imunomarcção para MMP-2 e MMP-9.....	30
6.6 Expressão de MMPs 2 e 9 por Meio da Técnica de Zimografia...	31
7. DISCUSSÃO.....	34
8. CONCLUSÕES.....	43
9. REFERÊNCIAS.....	44

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BSA: soro albumina bovino  
CaCl: cloreto de cálcio  
CB: célula basal  
DAB: diaminobenzidina  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
Gc: grupo controle  
Gi: grupo instrumentado  
Gnt: grupo não tratado  
Gt: grupo tratado  
HE: hematoxilina e eosina  
HCl: ácido clorídrico  
IHQ: imunohistoquímica  
kDa: kilodaltons  
LDP: lâmina dérmica primária  
LDS: lâmina dérmica secundária  
LEP: lâmina epidérmica primária  
LES: lâmina epidérmica secundária  
Log: logaritmo  
MB: membrana basal  
mmHg: milímetros de mercúrio  
mM: milimols  
MMPs: metaloproteinases  
MMP-2: metaloproteinase 2  
MMP-2 L+I: metaloproteinase 2 latente mais intermediária  
MMP-9: metaloproteinase 9  
NaCl: cloreto de sódio  
NGAL: lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos  
PAS: ácido periódico de Schiff  
PBS: solução tampão de fosfato  
ROS: espécies reativas de oxigênio  
SOD: superóxido dismutase  
TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
1- Distribuição dos grupos de acordo com o procedimento realizado.....	<b>13</b>
2- Escores de alterações morfológicas do córium laminar dos eqüinos dos grupos experimentais (baseado em POLLITT, 1996).....	<b>15</b>
3- Anticorpos utilizados para imunomarcção no tecido laminar.....	<b>17</b>
4- Medianas dos escores de alterações do tecido laminar observados nos grupos controle e experimentais (Gi, Gt e Gnt), com intervalos interquartis entre parêntesis. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.....	<b>23</b>
5- Médias e desvios padrão do número de células apoptóticas entre os grupos controle e experimentais (Gi, Gt e Gnt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.....	<b>26</b>
6- Medianas da intensidade de imunomarcção para MMP- 2 entre os grupos controle e experimentais (Gi, Gt e Gnt), com intervalos interquartis entre parêntesis. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.....	<b>28</b>
7- Medianas da intensidade de imunomarcção para MMP- 9 entre os grupos controle e experimentais (Gi, Gt e Gnt), com intervalos interquartis entre parêntesis. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.....	<b>29</b>
8- Valor de significância estatística entre os escores de alteração morfológica, MMP-2 e MMP-9, por meio do teste de Fisher.....	<b>31</b>
9- Médias e coeficiente de variabilidade das enzimas MMP-2 e MMP-9 entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), em $10^3$ pixels.....	<b>32</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1- Fotomicrografias do tecido laminar eqüino. Características morfológicas dos escores zero e 1.....	<b>20</b>
2- Fotomicrografias de tecido laminar eqüino. Características morfológicas dos escores 1 e 1,5.....	<b>21</b>
3- Fotomicrografias do tecido laminar eqüino. Características morfológicas da MB nos escores zero e 1,5.....	<b>22</b>
4- Medianas e intervalos interquartis dos escores das alterações morfológicas do tecido laminar observadas nos grupos controle e experimentais (Gi, Gt e Gnt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.....	<b>23</b>
5- Imunohistoquímica para caspase 3 e 14. Fotomicrografias do tecido laminar equino (A, C, D, F); fotomicrografia de linfonodo equino (B) e fotomicrografia de pele eqüina (E).....	<b>25</b>
6- Médias e desvios padrão do número de células apoptóticas dos grupos controle e experimentais (Gi, Gt e Gnt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.....	<b>26</b>
7- Imunohistoquímica para MMP-2. Fotomicrografia do tecido laminar equino (A, B, C, D e F). Fotomicrografia de tecido mamário de cadela (E).....	<b>27</b>
8- Medianas e intervalos interquartis dos escores para a Intensidade de imunomarcção para MMP-2 dos grupos controle e experimentais (Gi, Gt e Gnt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.....	<b>28</b>
9- Imunohistoquímica para MMP-9. Fotomicrografia do tecido laminar equino (A, B, C) e fotomicrografia de tecido mamário de cadela (E).....	<b>29</b>

- 10-** Medianas e intervalos interquartis das Intensidade de imunomarcação para MMP-9 dos grupos controle e experimentais (Gi, Gt e Gnt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si..... **30**
- 11-** Ilustração fotográfica da atividade enzimática das MMPs, registrada em gel de poliacrilamida. Nota-se que a apenas os grupos Gi, Gnt e Gt possuem a banda formada pela substância MMP-9 conjugada ao NGAL (C\_MM)-9/NAGL)..... **32**
- 12-** Densitometria de bandas para a enzima MMP-2, nas formas ativa (MMP-2A) e latente +intermediária (MMP-2L+I), entre os grupos controle e experimentais, e respectivo desvio padrão. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si..... **33**
- 13-** Densitometria de bandas para a enzima MMP-9, nas formas ativa (MMP-9A) e latente (MMP-9L), entre os grupos controle e experimentais, e respectivo desvio padrão. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si..... **33**
- 14-** Densitometria de bandas para o complexo MMP-9/NGAL (C\_MMP-9/NGAL) entre os grupos controle e experimentais, e respectivo desvio padrão. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si..... **34**

## **ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, APOPTOSE E EXPRESSÃO DE METALOPROTEÍNASES NO TECIDO LAMINAR DE EQÜINOS SUBMETIDOS A OBSTRUÇÃO INTESTINAL EXPERIMENTAL. EFEITOS DA HIDROCORTISONA**

**RESUMO:** A laminite está associada a ativação inflamatória sistêmica, a qual ocorre em diversas afecções, principalmente as gastrointestinais. Sua patogenia está relacionada a ativação de metaloproteinases e degradação do colágeno e/ou hemidesmossomos. O objetivo deste estudo foi analisar alterações morfológicas, apoptose, metaloproteinases (MMP) 2 e 9 e infiltração leucocitária, pela pesquisa da lipocalina liberada por neutrófilos (NGAL), no tecido laminar de eqüinos submetidos a obstrução intestinal experimental. Os animais foram distribuídos nos grupos: controle (Gc); instrumentado (Gi), com procedimento de enterotomia sem obstrução; obstruído tratado com hidrocortisona (Gt) e obstruído não tratado (Gnt). O tecido laminar foi analisado pelas técnicas de microscopia em luz, imunohistoquímica e zimografia. Os animais dos grupos experimentais (Gi, Gt e Gnt) demonstraram alterações morfológicas, MMPs e substância formada pela MMP-9 e NGAL superiores aos resultados do Gc. A presença de apoptose não foi evidenciada pelo procedimento cirúrgico. O Gc não foi diferente quanto às alterações morfológicas quando comparado ao Gi, e também não diferiu do Gt em relação à MMP-9, principalmente associada a neutrófilos. Com estes resultados, conclui-se que: o modelo experimental pode causar alterações morfológicas associadas a laminite; a apoptose não participa da fase inicial de alterações laminares no córium laminar; a hidrocortisona pode ser utilizada para coibir os efeitos deletérios da ativação inflamatória associada a diversas doenças, sem comprometer o córium laminar.

**Palavras-chave:** eqüino, laminite, metaloproteinases, apoptose, obstrução intestinal, infiltração leucocitária

**MORPHOLOGIC ALTERATION, APOPTOSIS AND EXPRESSION MATRIX METALLOPROTEINASES IN LAMINAR TISSUE OF HORSES SUBJECTED TO INTESTINAL OBSTRUCCION EXPERIMENTAL. EFFECTS OF HYDROCORTISONE**

**SUMMARY:** The laminitis is associated to systemic inflammatory activation that occur in several diseases, mainly gastrointestinal. The pathogeny of the laminitis is related to matrix metalloproteinases (MMPs) activation with collagen or hemidesmosmosos degradation. The aim of this study is evaluated of the morphologic alterations, apoptosis, MMPs 2 and 9 and leukocyte infiltration, for research of MMP-9 related to neutrophil gelatinase associated to lipocalin (NGAL) in laminar corium of horses subjected to intestinal obstruction experimental. The animals were divided in groups: control (Gc); instrumented (Gi), with enterotomy without obstruction; obstruction treated by hydrocortisone (Gt) and without treatment (Gnt). The laminar tissue was analyzed by optical microscopy, immunohistochemistry and zymography. The animals showed morphologic alterations, MMPs expression and MMP-9 associated to NGAL greater the Gc. The presence of apoptosis was not evidend by cirurgical procedure. However, the Gc was not different to Gi about morphologic alterations, and too Gt, about MMP-9, mainly the form conjugated to NGAL. The results indicate that the experimental model can cause morphologic alterations associated with laminitis. The apoptosis is not prerequisite for laminar lesion. The hydrocortisone can be administrated to reduce the deleterious effects of inflammatory activation in several diseases, without to affect the laminar corium.

**Key words:** horse, laminitis, matrix metalloproteinases, apoptosis, intestinal obstruction, leukocyte infiltration

## 1. INTRODUÇÃO

A laminite é uma das mais devastadoras condições mórbidas que afeta os equídeos. Ela está associada às doenças que desencadeiam comprometimento inflamatório sistêmico podendo, também, estar associada às alterações metabólicas como a obesidade.

A definição de laminite, segundo o termo, é inflamação das lâminas do casco. No entanto, essa denominação caiu em desuso pelos estudiosos da área, pela ausência de processo inflamatório típico. Muitos pesquisadores preferem utilizar a definição “degeneração laminar”, em virtude dos achados de desestruturação morfológica observados no tecido laminar de animais acometidos pela doença podal. No entanto, achados de pesquisas recentes possam remeter a adoção do antigo termo, pelas evidências de envolvimento de diversos mediadores inflamatórios descritos na fase prodrômica da laminite, inclusive infiltrado leucocitário.

Como a patogênese da doença permanece desconhecida, raras medidas terapêuticas apresentam resultados práticos, sendo mais efetivas na fase de desenvolvimento da laminite, quando os sinais clínicos ainda são incipientes. Pouco se pode fazer para efetivamente melhorar a condição precária a que os animais são submetidos quando a doença já se manifestou, principalmente se já houver ocorrido a rotação da falange distal, prenúncio da fase crônica.

Desta forma, a busca pelos fatores envolvidos na patogênese da laminite se faz necessária principalmente para guiar o tratamento preventivo e terapêutico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A laminite é uma doença podal grave que acomete os equídeos, sendo responsável por sofrimento intenso. Ela é observada comumente como sequela de distúrbios gastrintestinais, respiratórios e reprodutivos que deflagram quadro inflamatório sistêmico (EADES et al., 2002; PARSONS et al., 2007), afetando também animais com alterações endócrinas (EADES et al., 2002; JOHNSON et al., 2002).

Esta enfermidade é base de muitos estudos no mundo todo, realizados com a intenção de conhecer o mecanismo de desenvolvimento da doença. O quadro de laminite é, em geral, induzido experimentalmente em equinos, por meio de administração de carboidratos, extrato de noqueira preta ou oligofrutose (GARNER et al., 1975; POLLITT & VAN EPS, 2002). No entanto, pouco se tem avançado no que diz respeito às alterações do tecido laminar em equinos com enfermidades gastrintestinais (RIO TINTO et al., 2004).

A fisiopatogenia da laminite está relacionada à degradação da membrana basal (MB) e/ou perda dos hemidesmossomos, os quais fazem a união entre a lâmina densa da membrana basal e as células epidérmicas (POLLITT & DARADKA, 1998; FRENCH & POLLITT, 2004). A membrana basal se localiza entre as lâminas dérmicas e epidérmicas, sendo que estas estruturas formam interdigitações que são responsáveis pela fixação da falange distal à parede do casco. A falência desta estrutura pode resultar em rotação e/ou afundamento da falange distal (POLLITT, 1996). A MB é composta por laminina (glicoproteína) e colágeno tipos IV e VII (POLLITT, 1994). Existem inibidores teciduais e sanguíneos para prevenir a degradação laminar excessiva, como exemplo, o inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP) nos tecidos, e a  $\alpha_2$ -macroglobulina no sangue (POLLITT, 1996; POLLITT, 2003).

A patogenia da laminite pode estar associada à degradação do colágeno devido a superativação das metaloproteinases presentes no tecido laminar (POLLITT, 1994), produzidas pelas células basais para o controle do crescimento normal do casco, constituindo a base da teoria enzimática. A concentração de metaloproteinases aumenta de maneira considerável 48 horas após a indução de laminite por administração de carboidratos (KYAW-TANNER & POLLITT, 2004). A ativação destas enzimas ainda é pouco conhecida, sugerindo-se o envolvimento de toxinas bacterianas, absorvidas do trato gastrointestinal, e de citocinas inflamatórias deflagradas nos quadros de ativação inflamatória sistêmica, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (POLLITT, 1999; HAN et al., 2000; HAN et al., 2001). Dentre as toxinas bacterianas que ativam as MMPs, as exotoxinas de espécies de *Streptococcus*, especialmente *Streptococcus bovis* assumem grande importância (POLLITT, 1999; MUNGALL et al., 2001; MILINOVICH et al., 2007). As MMPs podem, ainda, ser liberadas por leucócitos que migraram para os tecidos laminares (BELKNAP & BLACK, 2005).

Acredita-se que exista envolvimento direto de fatores presentes no lúmen intestinal que, direta ou indiretamente, possam ativar as MMPs e iniciar a degradação descontrolada do colágeno. Estes fatores estão presentes no tecido laminar em menos de 24 horas após o início do processo primário (LOFTUS et al., 2007; NOURIAN et al., 2007). A acidose cecal parece estar estritamente relacionada ao aumento destas substâncias desencadeadoras da laminite, pois a administração de solução tamponante mostrou-se efetiva na redução da quantidade de MMPs no tecido laminar (SOUZA et al., 2006).

Existem duas gelatinases distintas da família das MMPs, encontradas também como pró-enzimas. O aumento de ambas nem sempre ocorre (JOHNSON et al., 1998). A MMP-9 tem sido associada a processos inflamatórios por ser ativada por citocinas pró-inflamatórias e liberada por leucócitos, possuindo distribuição limitada entre os tecidos quando comparada à MMP-2, a qual é

observada de maneira constitutiva no tecido laminar (KYAW-TANNER & POLLITT, 2004).

A anatomopatologia do casco afetado pela laminite é analisada com base nas alterações características da laminite; sendo macroscopicamente visualizadas pela deformação do casco e rotação da falange distal na fase crônica, e microscopicamente, pelas mudanças morfológicas do tecido laminar. A classificação utilizada atualmente (POLLITT, 1996) considera, principalmente, as alterações presentes nas células basais (CB), o formato da lâmina epidérmica secundária (LES) e o contorno da membrana basal (MB) (POLLITT, 1996). CROSER & POLLITT (2006) demonstraram, através de biópsia seriada do tecido laminar em equinos com indução da doença, que os eventos morfológicos iniciais como arredondamento do núcleo das células basais, que se tornam progressivamente mais próximos da membrana basal e afilamento da extremidade das LES, com redução do espaço ocupado pelas lâminas dérmicas secundárias (LDS). A degradação da membrana basal ocorre entre 36 e 48 horas.

Como a etiopatogenia da laminite permanece desconhecida, existem teorias, além da enzimática, para tentar explicá-la. Dentre elas se destacam a vascular, trombogênica, metabólica (HOOD, 1999; JOHNSON, 2002) e, a que foi recentemente levantada, a teoria inflamatória, de envolvimento sistêmico (MOORE & BELKNAP, 2008). As teorias muitas vezes se relacionam, o que classifica a enfermidade como multifatorial.

A teoria vascular postula que as lesões do tecido laminar são causadas por vasoconstrição digital e/ou abertura de anastomoses arteriovenosas no tecido laminar, levando a estase sanguínea e, conseqüentemente, edema tecidual e necrose (HOOD et al., 1978; ALLEN et al., 1990; KEEN et al., 2008; NOSCHKA et al., 2008). Exames de cintilografia, demonstraram redução da perfusão sanguínea no período prodromico da laminite (GALEY et al., 1990). Atualmente, evidências do envolvimento inflamatório sistêmico demonstram que os mediadores inflamatórios, principalmente citocinas, podem agir causando vasoconstrição

digital, que está associada à fase prodrômica da laminite (NOSCHKA et al., 2008). Estudos demonstraram que ocorre maior contratilidade nas veias laminares do que nas artérias laminares, quando estas são sensibilizadas com vasoconstritores agonistas, sendo essa resposta o oposto da encontrada nos vasos digitais, em que as artérias sofrem maior contratilidade que as veias (PERONI et al., 2005; PERONI et al., 2006). A endotelina-1 (ET-1), secretada pelo endotélio, causa vasoconstrição três vezes maior em veias do que em artérias. Sua secreção é regulada pelo óxido nítrico, vasodilatador também produzido pelo endotélio, e existindo evidências de desequilíbrio dessas duas substâncias na laminite aguda (VENUGOPAL et al., 2001). No entanto, achados experimentais contestam a vasoconstrição como evento primordial para o aparecimento da laminite, como a ausência da xantina oxidase, enzima liberada durante a isquemia tecidual (LOFTUS et al., 2007). Existem evidências da vasodilatação, presente no início de desenvolvimento da doença, a qual está associada ao aumento da temperatura e fluxo sanguíneo no tecido laminar (POLLITT & DAVIES, 1998; POLLITT, 1999, POLLITT, 2003). POLLITT & DAVIES (1998) sugerem que, após a sobrecarga de carboidratos, ocorra um período de 12 a 40 horas de vasodilatação sublaminar, precedendo os sinais clínicos da laminite

A teoria trombogênica afirma que a patogenia da laminite está relacionada a agregação e adesão plaquetária sobre o endotélio íntegro, evento frequentemente associado a animais com abdômen agudo (REININGER et al., 1998; DIVERS, 2003). WEISS et al. (1995) observaram a formação de microtrombos na parede de vasos localizados na lâmina dérmica e, por meio de arteriografia, redução do fluxo sanguíneo para o membro. Semelhantemente ao que ocorre na síndrome metabólica no homem, que é caracterizada por eventos inflamatórios e pró-trombóticos (ODROWAZ-SYPNIEWSKA, 2007), é possível que o mesmo mecanismo possa acontecer nos equinos, predispondo à doença por afluxo sanguíneo insuficiente (ROBERTSON et al. 2008). No entanto, a administração de heparina, após 24 horas da indução de laminite, não apresenta efeito benéfico no

desenvolvimento das lesões características de laminite (MARTINS FILHO et al., 2008), talvez pela administração em período posterior à formação dos trombos no tecido laminar.

A teoria metabólica está pautada na observação de laminite em animais com síndrome de Cushing, administração prolongada e em altas doses de glicocorticóides e a intolerância à insulina, observada em animais obesos (JOHNSON et al., 2002). A relação da laminite com estas alterações endócrinas foi mais bem observada por meio da indução da doença com infusão contínua de insulina em pôneis normais (ASPLIN et al., 2007). Da mesma forma, existe relação da laminite com resposta inflamatória sistêmica, que neste particular, parece ser despertada pelas próprias alterações metabólicas. Sabe-se que a obesidade causa aumento de citocinas inflamatórias, provavelmente pela produção destas por adipócitos (HUTLEY & PRINS, 2005; VICK et al., 2007). A hiperglicemia e resistência à insulina parecem estar implicadas no desenvolvimento de um “estado inflamatório”, com inflamação sistêmica subaguda crônica (SHOELSON et al., 2006; GEOR & FRANK, 2008), o que tornaria os animais com estas alterações menos tolerantes aos efeitos deletérios da resposta inflamatória que ocorre na sepse (VAN EPS & POLLITT, 2006; EADES et al., 2007), semelhante ao que ocorre no homem (SINGER & GRANGER, 2007).

Os achados de vários estudos realizados no período de desenvolvimento da laminite induzida experimentalmente fornecem fundamentos sobre o envolvimento da ativação inflamatória sistêmica na patogenia da laminite, como a presença de citocinas inflamatórias circulantes (LOFTUS et al., 2007; NOSCHKA et al., 2009), espécies reativas de oxigênio (HURLEY et al., 2006) e infiltração leucocitária tecidual, a qual pôde ser observada graças a implementação de técnicas laboratoriais específicas (BLACK et al., 2006; HURLEY et al., 2006; LOFTUS et al., 2006; FALEIROS et al., 2009). A explicação para a ativação inflamatória sistêmica pode ser de origem infecciosa, como por endotoxinas, que foram detectadas no início da doença (BAILEY et al., 2008), ou injúria tecidual,

observada no quadro de abdômen agudo (EADES et al., 2002; RIO TINTO et al., 2004).

A administração de endotoxina, segundo HUNT et al. (1990), não promove sinais clínicos de laminite em cavalos, mas não foi encontrado nenhum relato de alterações morfológicas após esta prática nesta espécie, apenas em bovinos, nos quais houve alterações do tecido laminar (BOOSMAN et al., 1991) sem a presença de sinais clínicos da afecção podal. Deve-se considerar que este modelo experimental, por gerar ativação inflamatória maciça, porém transitória (BENJAMIN, 2001), pode não desencadear alterações morfológicas laminares consistentes com o aparecimento de sinais clínicos de laminite. Portanto, modelos que provavelmente levam a liberação contínua de endotoxinas, como a injúria intestinal, promovem a ativação inflamatória sustentada (BENJAMIN, 2001) para que seja possível associar as alterações morfológicas no tecido laminar com os sinais clínicos da doença (POLLITT, 2007). Embasando ainda mais essa hipótese, Duncan et al. (1985) demonstraram que a infusão contínua de endotoxina causou redução da temperatura do casco e que os equinos apresentaram visível desconforto podal.

A ativação inflamatória sistêmica pode ser deflagrada pela injúria de isquemia-reperfusão observada em afecções gastrintestinais (BONE et al., 1996; EADES et al., 2002; RIO TINTO et al., 2004; BIANCO-BLATLLES et al., 2008), promovendo a liberação de diversos mediadores inflamatórios e, principalmente, espécies reativas de oxigênio as quais podem modificar a estrutura de proteínas e carboidratos, representando o quadro de estresse oxidativo (HALLIWELL, 1989; CAMPOS & YOSHIDA, 2004).

Estas evidências de envolvimento inflamatório na fase de desenvolvimento da laminite permitem associar a doença com a falência orgânica no homem, onde a resposta inflamatória sistêmica leva à injúria de locais distantes ao sítio da afecção (BELKNAP et al.; 2009). Neste contexto, a infiltração leucocitária, observada nos períodos iniciais de desenvolvimento da laminite (BLACK et al.,

2006; HURLEY et al., 2006) tem papel fundamental na patogenia da laminite pela liberação de substâncias lesivas aos tecidos, como as MMPs (STETLER-STEVENSON, 1990), mieloperoxidase, espécies reativas de oxigênio (BELKNAP & BLACK, 2005; HURLEY et al., 2006; RIGGS et al., 2007).

A lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos – NGAL, é uma proteína liberada pelos neutrófilos (BORREGAARD & COWLAND, 1997), produzida nos precursores de polimorfonucleares na medula óssea e estocada até que a célula seja ativada (FLOWER, 1996). Esta proteína tem sido encontrada em tecidos sobre estresse em associação com a MMP-9 (GUPTA et al., 2007; LORENCINI et al., 2009) provavelmente com a função de proteger a MMP-9 contra sua autodegradação, contribuindo para um período enzimático proteolítico ativo mais longo desta protease (GUPTA et al., 2007). Muitos estudos sugerem que o NGAL possa ser marcador de lesões e da infiltração neutrofílica em diversos órgãos, (BU et al., 2006; HEMDAHL et al., 2006; GUPTA et al., 2007; SMITH et al., 2008), predizendo, inclusive, o agravamento do quadro clínico (BOLIGNANO et al., 2009). SHAPIRO et al. (2009) observaram que sua apresentação como biomarcador mostrou-se confiável para sepse, choque séptico e morte nos pacientes com comprometimento sistêmico.

A possível explicação para a injúria à distância, que é provocada pela resposta inflamatória sistêmica, comprometendo o tecido laminar nos equinos e não outros órgãos, pode ser a insuficiente quantidade da enzima superóxido dismutase (SOD) no tecido laminar quando comparada à outros órgãos (LOFTUS et al., 2007). A SOD possui importante atividade antioxidante, reduzindo os efeitos teciduais deletérios das espécies reativas de oxigênio pela dismutação destas substâncias (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005, MADESH et al., 2005). Esta particularidade do tecido laminar deve ser considerada face aos achados de aumento de espécies reativas de oxigênio em equinos com laminite induzida, tanto em concentrações séricas (HURLEY et al., 2006), como locais, no tecido laminar (YIN et al., 2008). Adicional a isso, alterações do tecido laminar puderam ser

observadas no estudo de STEWART et al. (2008), os quais demonstraram concentrações de mediadores inflamatórios neste tecido superiores aos de outros órgãos, como fígado e pulmão, durante a indução da laminite.

Evidências experimentais apontam a ocorrência de apoptose, em condições normais nas lâminas dérmicas e epidérmicas, e estando aumentada após o aparecimento dos sinais clínicos da laminite (FALEIROS et al., 2004, SOUZA, 2007). A apoptose é uma forma fisiológica de morte celular oposta à mitose, de ocorrência normal para regulação da homeostase e crescimento tecidual (TARNAWSKI & SZABO, 2001; DENMEADE & ISAACS, 2005). Difere da necrose em virtude das células apoptóticas serem reconhecidas por macrófagos e ingeridas antes que se desintegram, evitando o derrame do conteúdo celular e, assim, não deflagrando inflamação e lesão tecidual (MEAGHER et al., 1992; COHEN, 1993). Sua ativação pode ocorrer por processos mórbidos, como na síndrome da imunodeficiência adquirida, desordens degenerativas e sepse (HASLETT & SAVILL, 2001).

A morte celular não seguida de autólise ou apoptose acontece pela ativação de proteases, chamadas caspases, que são encontradas sob a forma de pró-enzimas no citosol celular. Existem diversas caspases, que são ativadas em cascata, por duas vias principais. A via extrínseca, à qual pertence a caspase 8, é ativada por ligantes, como o TNF- $\alpha$ , que se acoplam a receptores (HERMAN et al., 2005; HOTCHKISS & NICHOLSON, 2006). A via intrínseca ou mitocondrial, que abrange a caspase 9, é ativada por diversos estímulos, como espécies reativas de oxigênio, radiação e agentes quimioterápicos. As duas vias ativam caspases efetoras, normalmente a caspase 3, que é crucial ao final da cadeia da morte celular programada (HOTCHKISS & NICHOLSON, 2006), causando destruição do DNA, por ativação de DNAase no núcleo celular, e desorganização da estrutura normal do citoesqueleto da célula (NICHOLSON, 1999; CREAGH et al., 2003; BOCCELLINO et al., 2004). Existem também caspases relacionadas à diferenciação celular normal como a caspase 14, que é expressa principalmente

no epitélio e mucosa oral, clivando proteínas estruturais ou ativando enzimas encontradas na camada granular que participam da formação do extrato córneo (ECKHART et al., 2000; KUECHLE et al., 2001; HATHAWAY & KUECHLE, 2002).

Existem inúmeras medidas indicadas para a prevenção e tratamento da laminite, sendo muitos empíricos e controversos pelo conhecimento incompleto da patogenia da doença (EADES et al., 2002). A crioterapia aplicada aos cascos é uma medida de boa eficácia preventiva (VAN EPS & POLLITT, 2004), por causar redução da atividade metabólica e enzimática de leucócitos, diminuindo a liberação de mediadores inflamatórios (SWENSON et al., 1996; WORSTER et al., 2001).

Pelo mesmo raciocínio, a administração de anti-inflamatórios poderia impedir o desenvolvimento da laminite, face a presença significativa de mediadores inflamatórios na fase prodrômica da doença atenuando, assim, seus efeitos adversos (CAMPEBELL et al., 2007). A utilização de corticóides tem sido inicialmente desestimulada, pois muitas vezes o desenvolvimento de laminite é observado em animais que necessitam de doses altas e/ou repetidas desses medicamentos (POLLITT, 1999; JOHNSON et al., 2003, RYU et al., 2004). A administração diária de corticóides causa resistência à insulina, a qual também apresenta ligação com o desenvolvimento de laminite (BAILEY et al., 2007; TILEY et al., 2007). Todavia, achados de BRASIL et al. (1999) e ANNANE & CAVAILLO (2003) demonstraram que a utilização de corticosteróides inibe a liberação de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , reduzindo a proliferação e infiltração leucocitária, o que torna seu uso em modelos de sepsé benéfico.

Por todo o exposto, entender os mecanismos que levam ao desenvolvimento das lesões no tecido laminar de animais com abdômen agudo é essencial para a compreensão da patogenia da laminite, facilitando a adoção de medidas preventivas que possam reduzir a gravidade do quadro, uma vez instalado.

### **3. OBJETIVOS**

- ✓ Avaliar o modelo de injúria intestinal como indutor de alterações laminares
- ✓ Determinar o efeito da administração de hidrocortisona sobre as alterações do tecido laminar
- ✓ Contribuir, de modo geral, para o entendimento da fisiopatogenia da laminite

Estes objetivos foram pautados no estudo das alterações morfológicas, apoptose, expressão de MMPs 2 e 9 e atividade da MMP-9 conjugada a NGAL, no tecido laminar de animais com obstrução intestinal.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Animais**

Foram utilizadas amostras do tecido laminar provenientes de vinte equinos adultos, sendo sete animais isentos de quaisquer procedimentos experimentais, representando o grupo controle e de outros treze após a obstrução intestinal experimental, distribuídos em três grupos: instrumentado, obstruído não tratado e obstruído tratado.

##### **4.1.1 Animais controle (Gc)**

Foram utilizadas amostras de tecido laminar de sete equinos, de sexo e idade desconhecida, peso médio de  $300 \pm 50$ , os quais foram considerados hígidos após inspeção sanitária. O material foi colhido de animais abatidos em

estabelecimento<sup>1</sup> comercial de abate de equinos. O fragmento laminar foi colhido da mesma forma em todos os animais, segundo a descrição contida no item 4.2.2.

#### **4.1.2 Animais submetidos a procedimentos cirúrgicos (Gi, Gt e Gnt)**

Foram utilizados treze equinos<sup>2</sup>, sendo sete machos e seis fêmeas, sem raça definida e com idade variando de dois a quinze anos, com peso de 300±63kg, considerados hígidos e sem alterações de deambulação. Os animais permaneceram em piquete coletivo, recebendo feno de *Coast-cross* (*Cynodon dactylon*) e água à vontade, recebendo vermífugo quinze dias antes do início do experimento. Os equinos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais. O grupo instrumentado (Gi) constituído de cinco animais, enquanto os grupos obstruídos não tratado (Gnt) e tratado (Gt) de quatro cavalos cada.

#### **4.2 Delineamento Experimental**

Os animais dos grupos Gi, Gt e Gnt foram submetidos a jejum alimentar de dezoito horas e restrição hídrica de quatro horas. Posteriormente foram sedados com cloridrato de xilazina 10%<sup>3</sup> (0,5 mg/kg, via intravenosa) e butorfanol<sup>4</sup> (0,1mg/kg, via intramuscular). A anestesia local foi realizada com cloridrato de lidocaína 2%<sup>5</sup> sem vasoconstritor, por meio da técnica de “L” invertido, como utilizado por FALEIROS (2003).

---

<sup>1</sup> Abatedouro e frigorífico Pomar SA, Araguari – MG , Brasil

<sup>2</sup> Material obtido do estudo “Obstrução experimental de jejuno de equinos tratados ou não com hidrocortisona: aspectos clínicos, hematológicos, bioquímicos e anatomopatológicos”, aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal, protocolo número 013598-06

<sup>3</sup> Sedazine – Fort Dodge, Overland Park – KS, Estados Unidos da América

<sup>4</sup> Torbugesic – Fort Dodge, Overland Park – KS , Estados Unidos da América

<sup>5</sup> Xilestesin 2% sem vasoconstritor – Cristália Hospitalar, Butantã – SP, Brasil

O terço médio do jejuno foi exposto pela realização de laparotomia pela fossa paracostal esquerda e submetido à compressão intramural da parede intestinal, mediante a implantação de um balão de látex vazio no lúmen, subseqüentemente ao procedimento de enterotomia, conforme protocolo utilizado por FALEIROS et al. (2002). O balão foi inflado até obter a pressão de 12 mmHg, sendo esta registrada e monitorada por meio de manômetro durante todo o período da obstrução, para que a pressão permanecesse a mesma mesma. Ao término de quatro horas, o balão foi retirado e decorrido o intervalo de dezoito horas os animais foram submetidos à eutanásia.

#### 4.2.1 Distribuição dos grupos

Os animais, com exceção do grupo controle, foram distribuídos casualmente nos grupos experimentais que constam na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos de acordo com o procedimento realizado

<b>GRUPO</b>	<b>PROCEDIMENTO</b>
Controle ( <b>Gc</b> )	Os equinos não foram submetidos a procedimentos cirúrgicos
Instrumentado ( <b>Gi</b> )	Os equinos foram submetidos a todas as manobras e métodos aplicados aos demais grupos, exceto a distensão do balão para provocar a obstrução intestinal.
Tratado ( <b>Gt</b> )	Os animais foram submetidos à isquemia do jejuno por meio da obstrução pelo balão inflado durante quatro horas, e receberam tratamento com hidrocortisona <sup>6</sup> , na dose de 4mg/kg, uma hora antes da desobstrução.
Não tratado ( <b>Gnt</b> )	Os animais foram submetidos à isquemia de jejuno durante quatro horas, sem receber tratamento.

#### 4.2.2 Extração do tecido laminar

<sup>6</sup> Solu-Cortef, Rhodia Farma Ltda, São Paulo – SP, Brasil

Os animais dos grupos Gi, Gnt e Gt foram submetidos à eutanásia por meio de superdosagem de anestésico (tiopental sódico IV e administração intra-tecal de lidocaína a 2%) e os animais do grupo controle por concussão cerebral por meio de pistola pneumática (dessensibilização central) e sangria da veia jugular e artéria carótida, segundo o protocolo adotado pelo frigorífico. As extremidades dos membros dos animais foram retiradas por meio de desarticulação metacarpofalangeana. Os cascos foram seccionados com a utilização de serra, de acordo com protocolo descrito previamente por POLLITT (1996). Os fragmentos obtidos pela retirada do tecido laminar, com auxílio de lâmina de bisturi nº 21, contendo a interface entre as lâminas dérmicas e epidérmicas. As amostras foram armazenadas de duas formas: fixadas em solução de formol a 10%, por período de 24 horas, desidratadas em álcool e incluídas em parafina; e pelo congelamento, imediatamente imersas em nitrogênio líquido e posterior acondicionamento em freezer a menos 70°C.

### **4.3 Análise em Microscopia de Luz**

Os fragmentos de tecido laminar foram cortados a 5µm de espessura e corados com os métodos histoquímicos hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS), e, posteriormente, submetidos à microscopia de luz. O corante PAS foi utilizado para a análise das alterações na membrana basal do tecido laminar.

A avaliação das lesões do tecido laminar baseou-se nos graus descritos por POLLITT (1996), estabelecendo-se escores intermediários para melhor classificar as lesões (Tabela 2). A classificação das alterações foi feita por análise cega, pelo mesmo observador.

Tabela 2 – Escores de alterações morfológicas do tecido laminar, presentes na maior parte do

cutis histológica, dos equinos dos grupos experimentais (adaptado de POLLITT, 1996)

<b>ESCORE</b>	<b>MORFOLOGIA OBSERVADA</b>
0	LES com extremidade arredondada, LEP retilínea e com extremidade arredondada, núcleos das CB ovalados e apicais, MB com contorno bem definido.
0,5*	Presença de núcleos de CB arredondados, mas com localização ainda apical em alguns segmentos, e de algumas LES com extremidade levemente afilada.
1,0	LES afiladas com redução do espaço pertencente a LDS, núcleos de CB arredondados e próximos à MB, LEP com extremidade levemente ondulada.
1,5*	LES marcadamente afiladas e alongadas, com redução da LDS entre as LES, núcleos de CB arredondados e próximos à MB, LEP com extremidade afilada e ondulada, entretanto, a MB se encontra com distância normal da LEP (espaço compreendido por 2 CB). MB contorno irregular e borrado.
2,0	Todas as alterações anteriores, com aumento significativo da distância entre o eixo queratinizado das LEP e MB, e esta se encontra serrilhada e ausente em vários segmentos na coloração de PAS.
3,0	Intensa destruição da arquitetura laminar, ausência marcante de MB, extremidade das LES sensivelmente afiladas e alongadas, formando uma massa amorfa de tecido entre LEP e LDP, causado também pelo descolamento das LES do eixo da LEP.

LES – lâmina epidérmica secundária; LEP – lâmina epidérmica primária; CB – célula basal; LDP – lâmina dérmica primária; MB – membrana basal. PAS – coloração de ácido periódico de Schiff.

\*valores intermediários utilizados neste estudo para classificação das lesões.

#### **4.4 Análise Imunohistoquímica (IHQ) para Detecção de Caspase 3 e 14 e Metaloproteinases (MMPs) 2 e 9**

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Neuropatologia, sob responsabilidade do Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi e co-orientação da Prof<sup>a</sup> Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, do Departamento de Patologia Veterinária, da FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP, com o intuito de identificar células em apoptose, por meio da imunomarcção da caspase 3, células em diferenciação celular, pela imunomarcção de caspase 14 e a presença de MMPs 2 e 9 no tecido laminar. O protocolo básico foi o mesmo para todos os anticorpos, variando o tipo de anticorpo, diluição e tempo de incubação, sendo estes apresentados na tabela 3. Os cortes do tecido laminar para a análise imunohistoquímica foram processados

em tecido incluído em parafina, cortados a 3µm de espessura e fixados em lâminas previamente preparadas com Poly-L-Lisina<sup>7</sup>. A desparafinização dos cortes foi feita em estufa à 60°C, durante 30 minutos. Posteriormente os cortes foram hidratados em soluções de xilol I e II por 20 minutos cada, e após passagem rápida em álcool absoluto (duas vezes), álcool 95%, álcool 80% e álcool 50%. A seguir foram lavadas em água destilada por dez vezes. A recuperação antigênica foi feita com solução tampão de citrato de sódio a 10mM, com pH 6,0, pelo vapor<sup>8</sup>, por vinte minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com leite em pó a 5% diluído em solução tampão de fosfato pH 6,0 (PBS), por vinte minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se um bloqueador comercial<sup>9</sup>, por dez minutos. Foi realizada a incubação com o anticorpo (Tabela 3). Os controles negativos foram incubados apenas com a solução diluidora<sup>10</sup> de anticorpos. Logo após incubou-se com o complexo estreptavidina-biotina<sup>11</sup>, com anticorpo secundário biotinilado universal por 30 minutos, seguido pela streptavidina também por 30 minutos. A revelação da reação foi feita com o cromógeno diaminobenzidina<sup>12</sup> (DAB), por três minutos, seguido de lavagem em água destilada. A contra-coloração dos cortes foi feita com hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com bálsamo do Canadá<sup>13</sup>, para posterior observação em microscópio óptico. Como controle positivo, utilizou-se linfonodo de equino para a caspase 3, para a caspase 14 um corte de pele de equino, e para as ambas as MMPs 2 e 9, tecido mamário de cadela. Para o controle negativo, como descrito acima, omitiu-se o anticorpo primário nos cortes de tecido laminar, incubando-se apenas o diluente do anticorpo.

---

<sup>7</sup> P-7886 Sigma Chemical Corporation, Saint Louis – MO, Estados Unidos da América

<sup>8</sup> Steam Cuisine, T-Fall, New Jersey, Estados Unidos da América

<sup>9</sup> TA-060-HP. Hydrogen Peroxidase Block, Lab Vision, Fremont – CA, Estados Unidos da América

<sup>10</sup> S3022, Dako Corporation, Carpinteria – CA, Estados Unidos da América

<sup>11</sup> LSAB, K0690, Dako Corporation, Carpinteria – CA, Estados Unidos da América

<sup>12</sup> K3468, Dako Corporation, Carpinteria – CA, Estados Unidos da América

<sup>13</sup> Labsynth, Diadema – SP, Brasil

Tabela 3 – Anticorpos utilizados para imunomarcação no tecido laminar

<b>ANTICORPOS PRIMÁRIOS</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DILUIÇÃO</b>	<b>INCUBAÇÃO</b>
Anti--caspase 3 <sup>14</sup>	coelho	1:700	15 horas ( <i>overnight</i> )
Anti- caspase 14 <sup>15</sup>	coelho	1:3000	30 minutos
Anti-MMP-2 <sup>16</sup>	camundongo	1:100	1 hora
Anti-MMP-9 <sup>17</sup>	cabra	1:200	1 hora

#### 4.5 Análise zimográfica das MMPs 2 e 9

A técnica de zimografia foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada, do Departamento de Imunologia, sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dagmar Machado, na Unicamp, Campinas, SP.

Para o processamento desta técnica, foram coletados fragmentos de tecido laminar e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, armazenados posteriormente em freezer a menos 70° C até a realização da técnica.

Os fragmentos do tecido laminar foram triturados e a extração das proteínas realizada em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,2M NaCl; 0,1% Triton; 10mM CaCl<sub>2</sub> e 1% *protease inhibitor cocktail*<sup>18</sup>, com o auxílio de um triturador. A quantificação protéica foi realizada de acordo com BRADFORD (1976), utilizando uma curva padrão de soro albumina bovino (BSA). A zimografia para análise da atividade das MMPs-2 e 9 foi realizada em gel de poliácridamida 10% contendo gelatina 0,1%. Aproximadamente 20µg de proteína por amostra foram aplicadas no gel. Após eletroforese, o gel foi lavado à temperatura ambiente com 2,5% Triton X-100, incubado *overnight* (15 horas aproximadamente) em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 contendo 0,1 M NaCl e 0,03% azida sódica, a

<sup>14</sup> ASP 175, Cell Signaling, Trask Lane – Danvers, Estados Unidos da América

<sup>15</sup> ab1653, Abcam, Cambridge – UK, Estados Unidos da América

<sup>16</sup> Ab-19 (clone CA-4001), Lab Vision, Fremont – CA, Estados Unidos da América

<sup>17</sup> sc-6840, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz – CA, Estados Unidos da América

<sup>18</sup> Sigma Chemical Company, Sant Louis – MO, Estados Unidos da América

37°C. O gel foi corado com *Coomassie brilliant blue*. As bandas correspondentes à atividade gelatinolítica puderam ser observadas após lavagem com solução contendo metanol (30%) e ácido acético (10%). Os géis foram avaliados pela densitometria das bandas por meio do programa *Scion Image*.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O método estatístico empregado para avaliar a existência de alterações morfológicas, células apoptóticas e imunomarcação para MMP-2 e MMP-9 foi o teste de Kruskal Wallis (não paramétrico, amostras independentes, comparações múltiplas) e para determinar a diferença, o teste de comparação múltipla de Dunn. Adotou-se o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A relação entre o grau de lesão histológica e intensidade de imunomarcação para MMP-2 e MMP-9 foi analisada por meio de tabela de contingência 4x3, considerando frequência de escores nos grupos experimentais, avaliada pelo teste exato de Fisher. As enzimas obtidas pelo método de zimografia, MMP-2 e MMP-9 foram avaliadas pela análise de variância de delineamento inteiramente casualizado, sendo a diferença detectada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A comparação dos dados entre os grupos foi feita pela média dos resultados obtidos nos membros torácicos direito e esquerdo.

## 6. RESULTADOS

Os animais submetidos ao procedimento cirúrgicos dos grupos instrumentado, tratado e não tratado permaneceram em posição quadrupedal após o procedimento cirúrgico, sem a presença de claudicação evidente durante a

deambulação.

### **6.1 Presença de Lesões Histológicas no Tecido Laminar**

A classificação das alterações morfológicas foi realizada por meio de escores pelo predomínio das mesmas no corte histológico.

As alterações observadas foram: células basais (CB) com núcleos arredondados, afilamento da extremidade da lâmina epidérmica secundária (LES), separação entre LES pouco distinta, com redução da lâmina dérmica secundária (LDS) entre elas, lâmina epidérmica primária (LEP) com extremidade afilada, e apresentando ondulações no seu eixo queratinizado, contorno da membrana basal (MB) indefinido, apresentando aspecto serrilhado e borrado em alguns segmentos (Figuras 1 a 3).

O grupo Gc não apresentou alterações histológicas marcantes do tecido laminar. Alguns animais apresentaram afilamento da extremidade das LES em pequena proporção e presença de células basais com núcleos arredondados, o que permitiu classificá-los como escore 0,5 (Figura 1).

Não foram observadas alterações na derme laminar dos equinos dos grupos controle e submetidos à cirurgia, exceto pela presença de poucas células inflamatórias demonstrando inflamação localizada em determinado ponto no tecido laminar de um animal (animal 6, Gi)

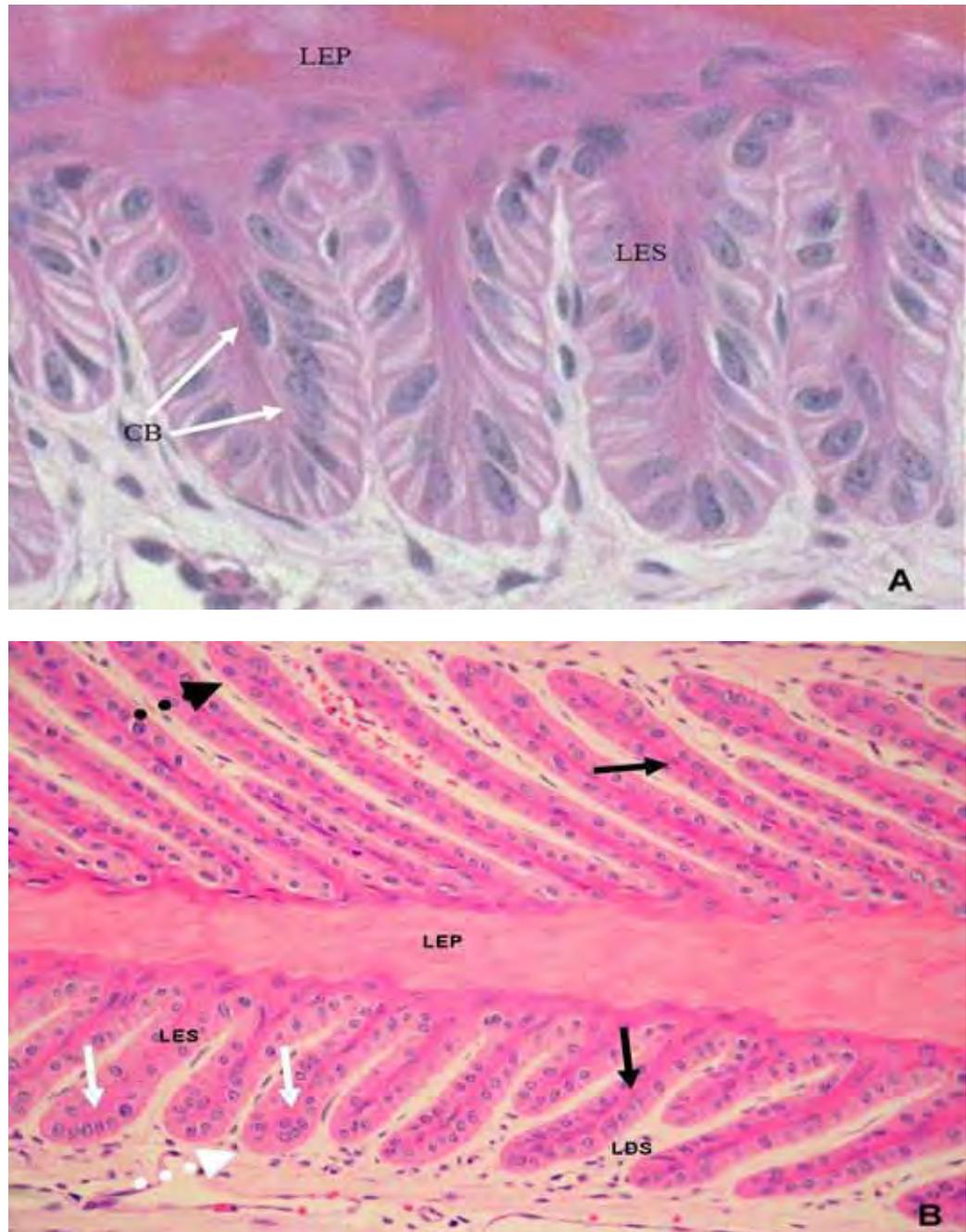


Figura 1 – Fotomicrografias do tecido laminar equino. Características morfológicas dos escores 0 e 1. **(A)** Presença de núcleos de células basais (CB) ovalados e apicais (setas), lâminas epidérmicas secundárias (LES) de extremidade arredondada (Gc, escore zero HE, obj. 40x). **(B)** Afilamento de algumas LES (setas pretas pontilhadas) LES com extremidade arredondada (setas brancas pontilhadas), presença de núcleo de CB esféricos (setas pretas contínuas) e núcleos ovalados (setas brancas contínuas) (Gi, escore 0,5 HE, obj. 20x)

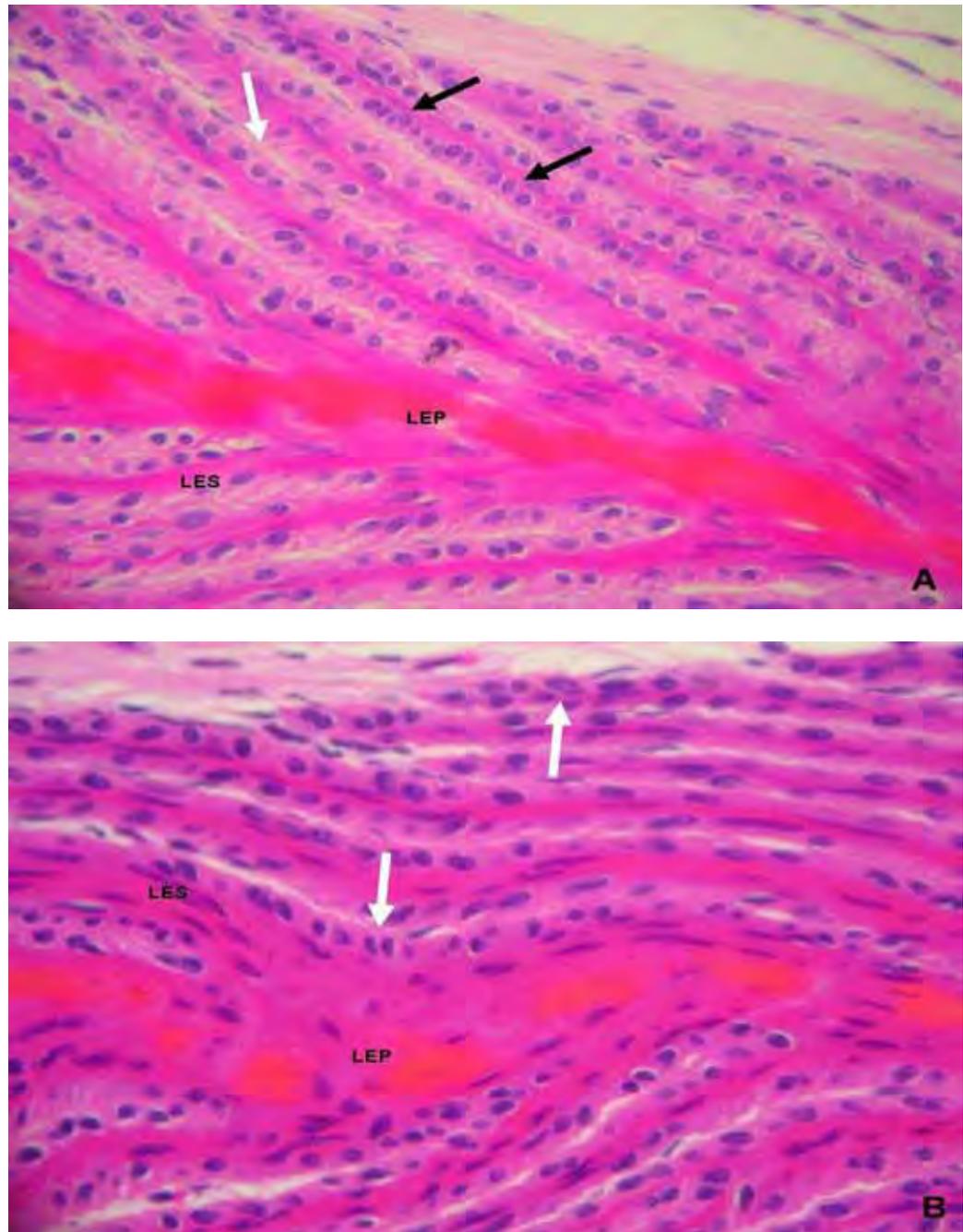


Figura 2 – Fotomicrografias de tecido laminar equino. Características morfológicas dos escores 1 e 1,5. **(A)** Núcleos esféricos de CB próximos a MB (setas pretas), afilamento das extremidades das LES e redução do espaço entre elas (seta branca) (Gt, escore 1 HE, obj. 40x). **(B)** Núcleos esféricos das CB (setas) e afilamento pronunciado da extremidade das LES (Gnt, escore 1,5 HE obj. 40x).

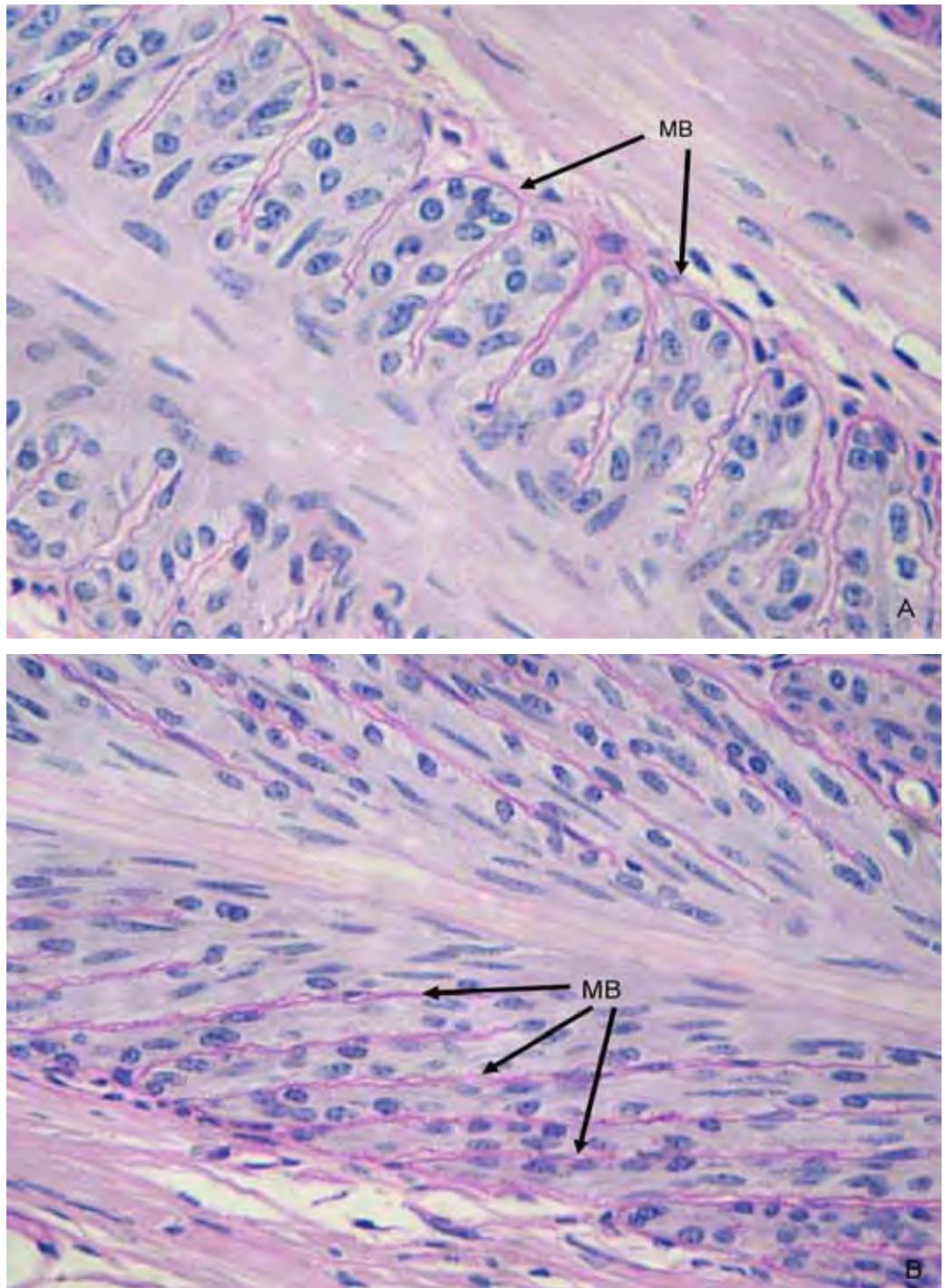


Figura 3 – *Fotomicrografias do tecido laminar equino. Características morfológicas da MB nos escores zero e 1,5. (A) Membrana basal (MB) íntegra (setas) (Gc, escore zer PAS, aproximado de obj 40x). (B) MB de contorno irregular e borrado (setas) em alguns segmentos da LES (Gt, escore 1 PAS, obj. 40x).*

A gravidade das lesões histológicas foi maior nos animais dos grupos obstruídos (Gt e Gnt) quando comparados ao Gc. As lesões observadas no Gi não diferiram dos outros grupos, Gc, Gt e Gnt (Tabela 4 e Figura 4).

Tabela 4 – Medianas dos escores de alterações do tecido laminar observados nos grupos controle e experimentais (Gi, Gnt e Gt), com intervalos interquartis entre parêntesis. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

<b>GRUPOS</b>	<b>Gc</b>	<b>Gi</b>	<b>Gnt</b>	<b>Gt</b>
MEDIANA	zero (0 – 0,25)	0,5 (0,25 – 1,25)	1,25 (1,12 – 1,5)	1,25 (1,12 – 1,25)
DOS ESCORES	a	ab	b	b

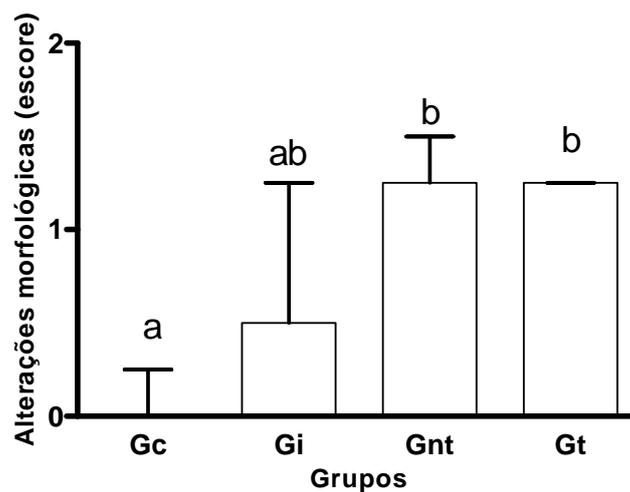


Figura 4 – Medianas e intervalos interquartis dos escores das alterações morfológicas do tecido laminar observadas nos grupos controle e experimentais (Gi, Gnt e Gt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

## 6.2 Imunomarcção para Caspase 3 e 14

A imunomarcção para detecção de apoptose foi positiva para o anticorpo anti-caspase 3, com marcação nuclear nas células basais, presentes na lâmina epidérmica secundária. O anticorpo anti-caspase 14 não apresentou

imunomarcção no tecido laminar (Figura 5). Foi feita contagem das células imunomarcadas pela caspase 3 por área de corte histológico (células/mm<sup>2</sup>).

Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais com respeito a contagem de células imunomarcadas para caspase 3, o que demonstra a presença de apoptose (Tabela 5 e Figura 6).

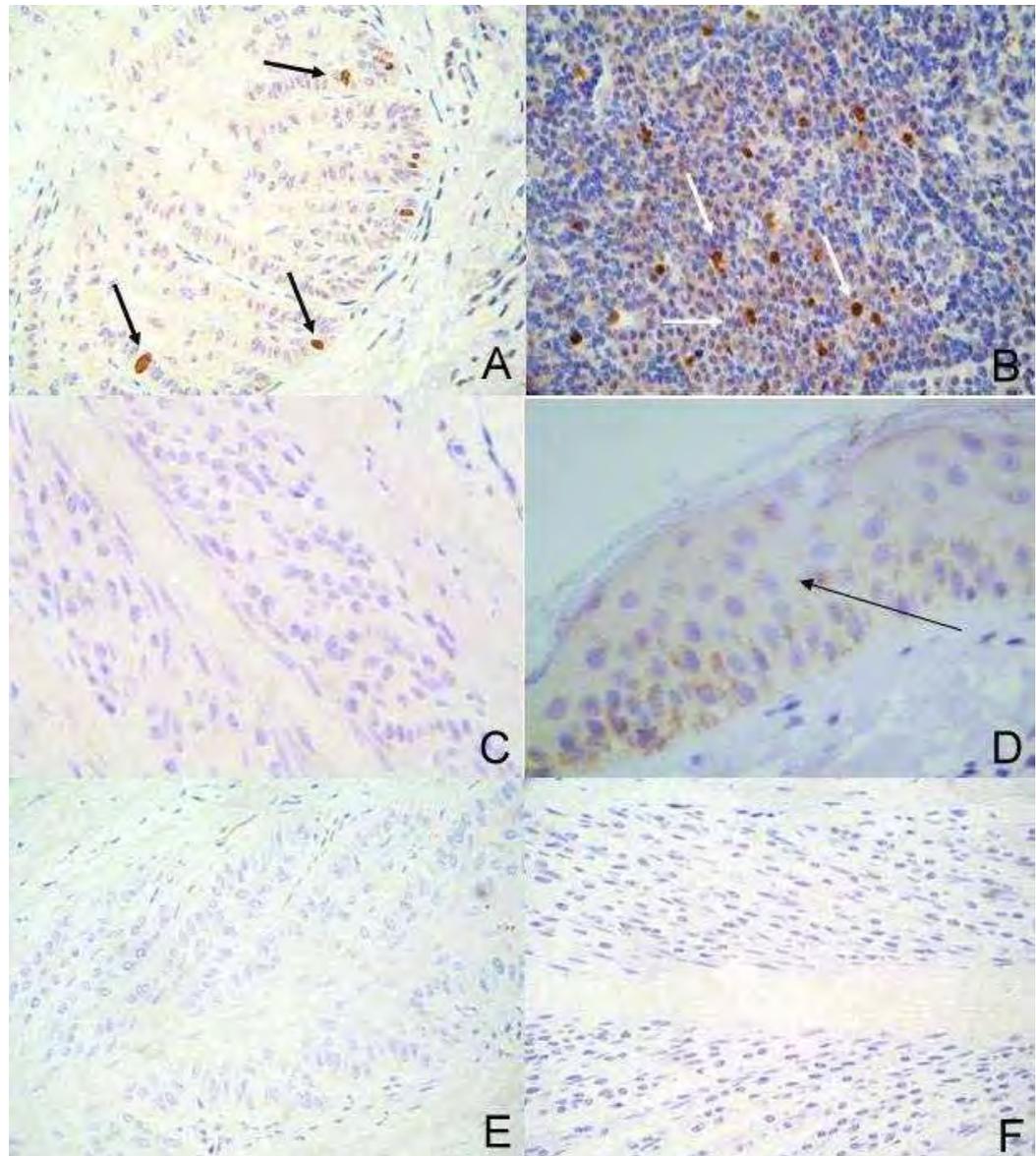


Figura 5 – *Imunohistoquímica para caspase 3 e 14. Fotomicrografias do tecido laminar equino (A, C, D, F); fotomicrografia de linfonodo equino (B) e fotomicrografia de pele equina (E). (A)* Imunomarcção para Caspase 3 nos núcleos das células basais (CB) (setas, Gnt). **(B)** Controle positivo para caspase 3 (setas). **(C)** Controle negativo da reação imunohistoquímica para caspase 3 (Gt). **(D)** Imunomarcção negativa para caspase 14 (Gt). **(E)** Controle positivo para caspase 14 (seta). **(F)** Controle negativo da reação de imunohistoquímica para caspase 14 (Gt). Método Imunohistoquímico Estreptavidina-Biotina (LSAB Kit, cromógeno DAB, obj. 40x).

Tabela 5 – Médias e desvios padrão do número de células apoptóticas entre os grupos controle e experimentais (Gi, Gnt e Gt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

<b>GRUPOS</b>	<b>Gc</b>	<b>Gi</b>	<b>Gnt</b>	<b>Gt</b>
MEDIA ± DESVIO PADRÃO (mm <sup>2</sup> )	1,8 ± 2 a	0,4 ± 0,6 a	1,9 ± 1,6 A	0,7 ± 1 a

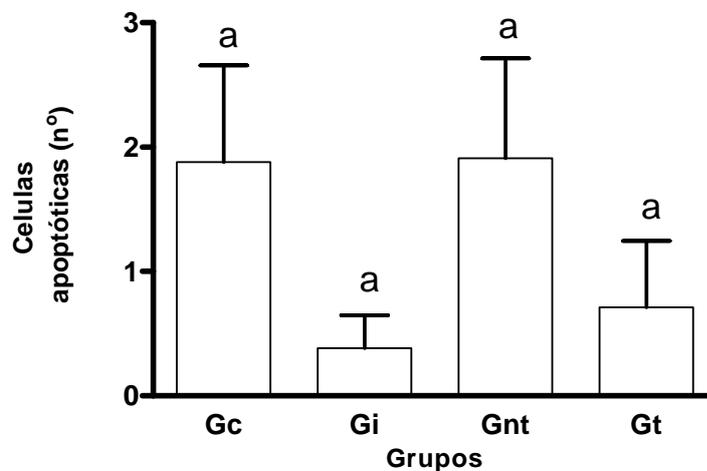


Figura 6 – Médias e desvios padrão do número de células apoptóticas dos grupos controle e experimentais (Gi, Gnt e Gt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

### 6.3 Intensidade de Imunomarcção para MMP-2

Todos os cortes de tecido laminar dos animais dos grupos experimentais apresentaram imunomarcção citoplasmática nas CB, abrangendo toda a LES, demonstrando como variação apenas a intensidade de marcação (Figura 7). A marcação foi classificada com escores de intensidade, variando de 0 (atenuada), 1 (leve), 2 (moderada) e 3 (intensa).

Houve aumento na intensidade de expressão de MMP-2 nos animais dos grupos obstruídos (Gt e Gnt) em relação ao Gc, e o Gi apresentou não diferiu dos demais (Tabela 6 e Figura 8).

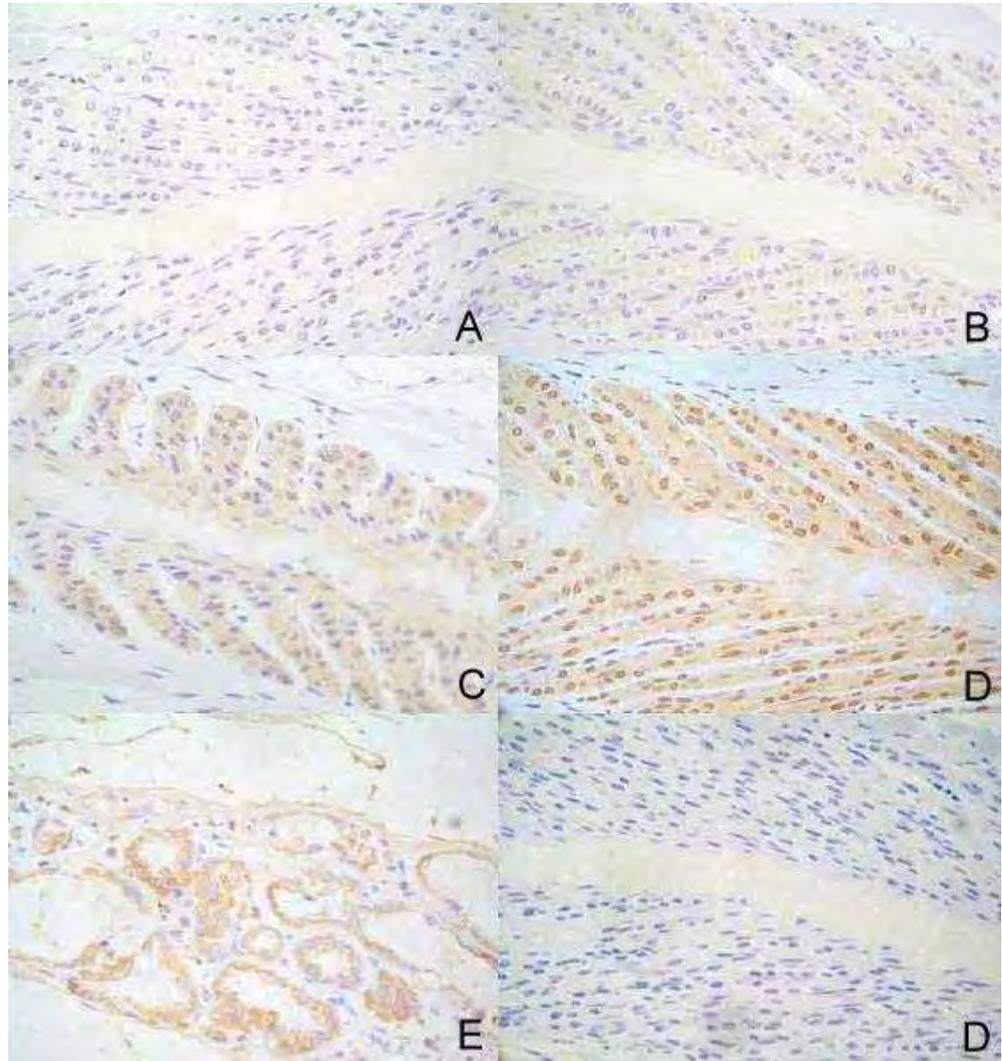


Figura 7 – *Imunohistoquímica para MMP-2. Fotomicrografia do tecido laminar equino (A, B, C, D e F). Fotomicrografia de tecido mamário de cadela (E.) (A) Escore 0 (Gc, obj 40x). (B) Escore 1 (Gi, obj 40x). (C) Escore 2 (Gt, obj. 40x). (D) Escore 3 (Gt, obj. 40x). (E) Controle positivo (obj 40x). (F) Controle negativo (Gnt, obj. 20X). Método Estreptavidina-Biotina (LSAB Kit, cromógeno DAB).*

Tabela 6 – Medianas da intensidade de imunomarcção para MMP-2 entre os grupos controle e experimentais (Gi, Gnt e Gt), com intervalos interquartis entre parêntesis. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

<b>GRUPOS</b>	<b>Gc</b>	<b>Gi</b>	<b>Gnt</b>	<b>Gt</b>
MEDIANA DOS	zero (0 – 0)	1,0 (0,75 – 1,5)	2,0 (2,0 – 2,0)	2,0 (1,75 – 2,25)
ESCORES	a	ab	b	b

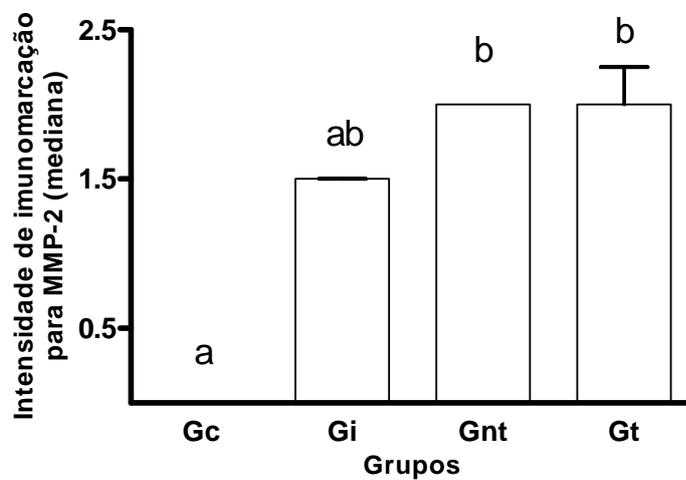


Figura 8 – Medianas e intervalos interquartis dos escores para a intensidade de imunomarcção para MMP-2 dos grupos controle e experimentais (Gi, Gnt e Gt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

#### 6.4 Intensidade de Imunomarcção para MMP-9

Todos os cortes de tecido laminar dos animais dos grupos submetidos a procedimento cirúrgico (Gi, Gt e Gnt) apresentaram imunomarcção citoplasmática nas células basais da LES (Figura 9). A classificação também foi realizada pela intensidade de marcação observada, variando de escore 0 (atenuada), 1 (discreta), 2 (moderada) e 3 (intensa).

Os grupos Gi e Gnt apresentaram aumento da expressão da MMP-9 quando comparado ao Gc. A intensidade de imunomarcção para MMP-9 no grupo tratado pela hidrocortisona (Gt) não diferiu dos demais (Tabela 7 e Figura 10).

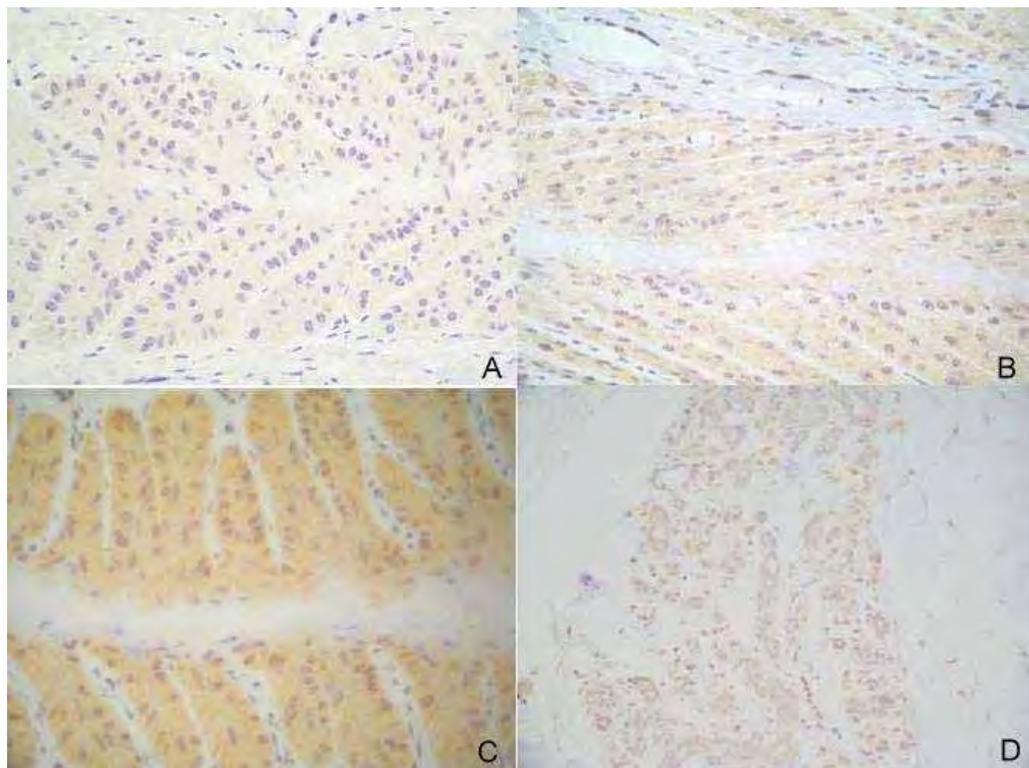


Figura 9 – Imunohistoquímica para MMP-9. Fotomicrografia do tecido laminar equino (A, B, C) e fotomicrografia de tecido mamário de cadela (E). (A) Escore 1 (Gc, obj. 40x). (B) Escore 2 (Gt, obj. 40x). (C) Escore 3 (Gnt, obj. 40x) (D) Controle positivo (obj. 40x). Método Estreptavidina-Biotina (LSAB Kit, cromógeno DAB).

Tabela 7 – Medianas da intensidade de imunomarcção para MMP- 9 entre os grupos controle e experimentais (Gi, Gnt e Gt), com intervalos interquartis entre parêntesis. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

GRUPOS	Gc	Gi	Gnt	Gt
MEDIANA DOS ESCORES	1,0 (1,0 – 1,0) a	2,0 (1,75 – 2,75) b	2,25 (1,75 – 2,5) b	1,75 (1,5 – 2,25) ab

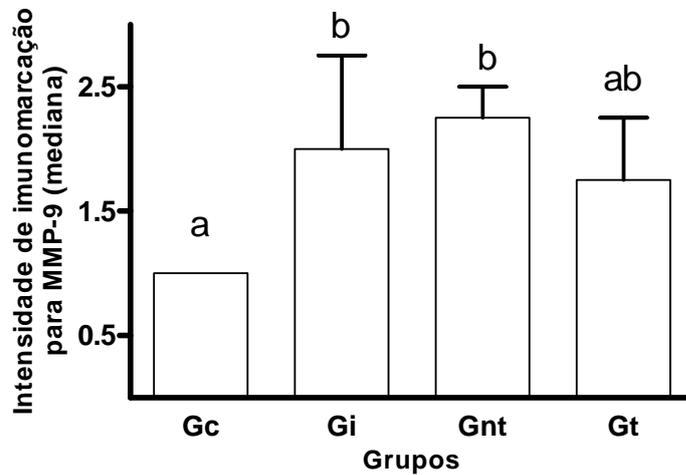


Figura 10 – Medianas e intervalos interquartis da intensidade de imunomarcção para MMP-9 dos grupos controle e experimentais (Gi, Gnt e Gt). Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

### 6.5 Relação de Dependência entre os Escores de Alteração Morfológica e a Intensidade de Imunomarcção para MMP-2 e MMP-9

Foi pesquisada a possível relação entre as alterações morfológicas, intensidade de imunomarcção para MMP-2 e intensidade de imunomarcção para MMP-9, considerando o papel destas enzimas na patogenia da laminite.

Houve relação entre os escores de lesão histológica e a imunomarcção para MMP-2 (Tabela 8).

Não existiu relação entre os escores de lesão tecidual e imunomarcção para MMP-9 (Tabela 8)

As expressões de MMP-2 e MMP-9 apresentaram interdependência (Tabela 8).

Tabela 8 – Valor de significância estatística entre os escores de alteração morfológica, MMP-2 e MMP-9, por meio do teste de Fisher

<b>Variáveis</b>	<b>MMP-2</b>	<b>MMP-9</b>
<b>Alteração morfológica</b>	$p = 5,89 \times 10^{-5*}$	$p = 0,0738$
<b>MMP-2</b>	-	$p = 0,0014*$

\*significativo a 5% ( $p \leq 0,05$ ),  $p < 0,01$  significativo a 1%,  $p > 0,05$  não significativo

### 6.6 Expressão de MMPs 2 e 9 por Meio da Técnica de zimografia

A densitometria da atividade da MMP-2 apresentou três isoformas, latente (pró-enzima), intermediária e ativa, sendo que não foi possível separar as bandas latente e intermediária (MMP-2L+I) para quantificação como amostras diferenciadas, e a MMP-2 ativa (densitometria de 62 kDa). A atividade da MMP-9 foi observada com as formas latente (92 kDa) e ativa (82 kDa). Foi possível observar, nos animais submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos instrumentado, tratado e não tratado, a substância formada pela conjugação da MMP-9 e lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos (NGAL), representada aqui como C\_MMP-9/NGAL, com densitometria de 135 kDa (Figura 11).

Os valores da média e desvio de cada grupo experimental em razão da variável analisada estão apresentados na Tabela 9, em  $10^3$  pixels.

Houve aumento significativo da atividade enzimática nos grupos com procedimento experimental (Gi, Gt e Gnt) para as variáveis MMP-2A, MMP-2L+I e MMP-9A (Figuras 12 e 13).

A enzima MMP-9L não apresentou diferença entre os grupos experimentais (Figura 13).

O C\_MMP-9/NGAL não apresentou diferenças entre os grupos Gc e Gt. Na comparação com os demais grupos, não houve diferença entre os grupos com procedimento cirúrgico (Gi, Gt e Gnt). Os grupos Gi e Gnt diferiram do Gc (Figura 14).

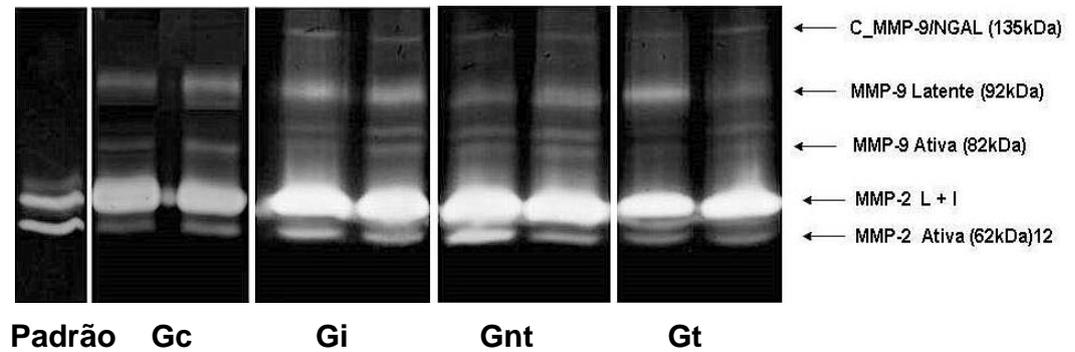


Figura 11 – Ilustração fotográfica da atividade enzimática das MMPs, registrada em gel de poliacrilamida. Nota-se que a apenas os grupos Gi, Gnt e Gt possuem a banda formada pela substância MMP-9 conjugada ao NGAL (C\_MM)-9?NAGL)

Tabela 9 – Médias e coeficiente de variabilidade das enzimas MMP-2 e MMP-9 entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), em  $10^3$  pixels.

<b>VARIAÇÃO</b>	<b>Gc<sup>1</sup></b>	<b>Gi<sup>1</sup></b>	<b>Gt<sup>1</sup></b>	<b>Gnt<sup>1</sup></b>	<b>C. V.</b>
MMP-2 <sup>a*</sup>	13 ± 3 a	141 ± 85 b	89 ± 45 b	98 ± 34 b	61
MMP-2L+I <sup>*</sup>	77 ± 9 a	635 ± 164 b	515 ± 147 b	601 ± 99 b	27
MMP-9A <sup>*</sup>	10 ± 3 a	67 ± 41 b	62 ± 20 b	61 ± 17 b	50
MMP-9L <sup>*</sup>	13 ± 7 a	71 ± 62 a	63 ± 51 a	80 ± 55 a	92
C_MMP-9/NGAL <sup>*</sup>	zero a	30 ± 24 b	16 ± 19 ab	31 ± 16 b	93

\* Valores transformados em  $\log(\text{observação}+1)$ ;

<sup>1</sup> Valores não transformados. Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

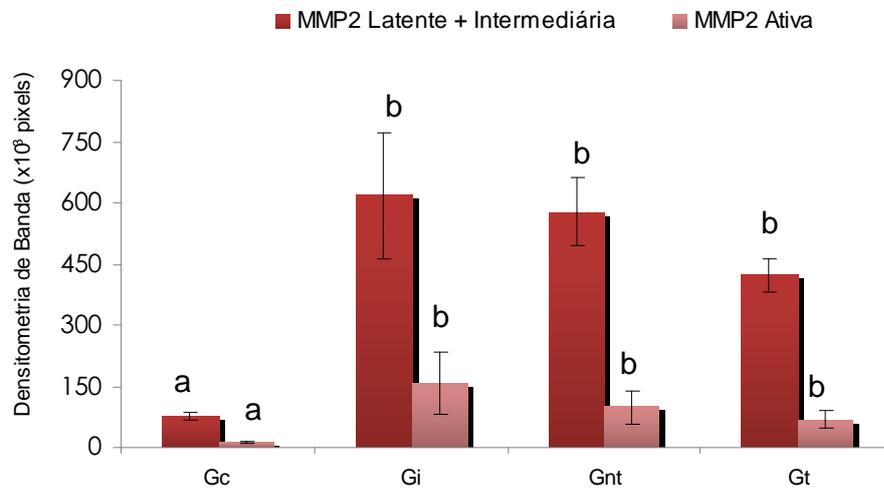


Figura 12 – Médias e desvio padrão da densitometria de bandas para a enzima MMP-2 nas formas ativa (MMP-2A) e latente + intermediária (MMP-2L+I), entre os grupos controle e experimentais, e respectivo desvio padrão. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

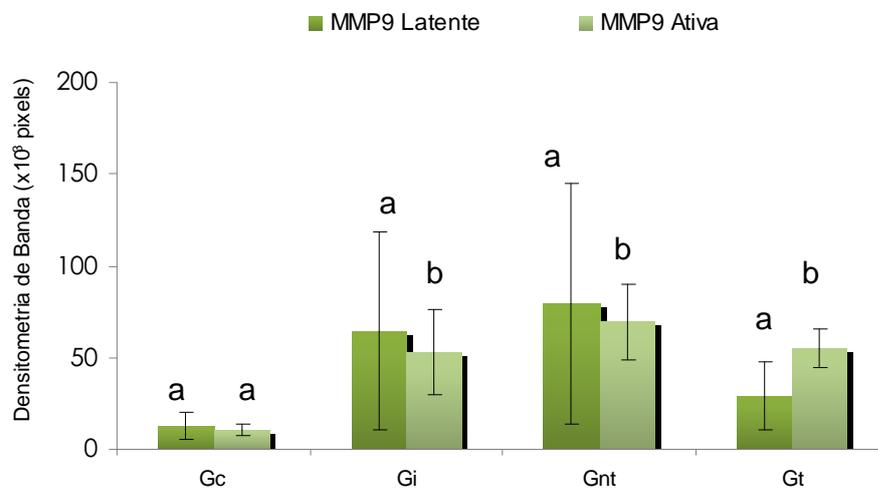


Figura 13 – Médias e desvio padrão da densitometria de bandas para a enzima MMP-9, nas formas ativa (MMP-9A) e latente (MMP-9L), entre os grupos controle e experimentais, e respectivo desvio padrão. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

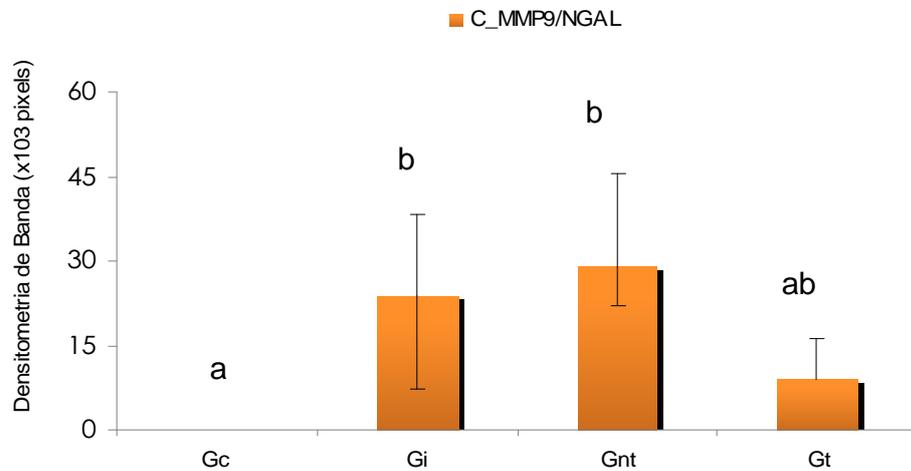


Figura 14 – Médias e desvio padrão da densitometria de bandas para o complexo MMP-9/NGAL (C\_MMP-9/NGAL) entre os grupos controle e experimentais, e respectivo desvio padrão. Colunas marcadas pela mesma letra não diferem entre si.

## 7. DISCUSSÃO

As principais alterações morfológicas observadas no tecido laminar foram, principalmente, a presença de núcleos esféricos, afilamentos das LES e redução do espaço entre as LES, alterações estas que caracterizam os eventos iniciais da laminite, segundo CROSER & POLLITT (2006). Estas alterações foram mais acentuadas nos animais dos grupos submetidos aos procedimentos cirúrgicos (Gi, Gt e Gnt), os quais apresentaram escore variando de 0 a 1,5. Os animais com escore 1,5 apresentaram as características próximas às descritas por POLLITT (1996) para o escore 2, no entanto não foi notado aumento significativo da distância entre a MB e o eixo queratinizado da LEP. Face ao exposto, foram classificadas seguindo uma nova proposta, como escore 1,5 (Figura 3). Alguns cortes histológicos demonstraram membrana basal com aspecto irregular e borrado, de contorno indefinido em alguns segmentos. Esta característica pode

estar relacionada à degradação da MB, na fase inicial, provavelmente por MMPs, e que leva à falência da união entre as lâminas dérmicas e epidérmicas (POLLITT, 1996; POLLITT & DARADKA, 1998; CROSER & POLLITT, 2006).

Todos os animais dos grupos submetidos aos procedimentos cirúrgicos (Gi, Gt e Gnt) apresentaram alterações morfológicas, sendo que a diferença de intensidade observada entre as alterações dos grupos obstruídos (Gt e Gnt) e do Gc indicam que o dano provocado pela isquemia intestinal pode lesar o tecido laminar, predispondo à laminite.

Os dados obtidos por meio da obstrução luminal dos equinos trazem evidências passíveis de serem associadas com a fase de desenvolvimento da laminite. Existem diversos achados experimentais demonstrando a participação da resposta inflamatória sistêmica na fase inicial da laminite, como aumento de citocinas inflamatórias (LOFTUS et al., 2007; NOSCHKA et al., 2009), infiltração leucocitária (BLACK et al., 2006; HURLEY et al., 2006; LOFTUS et al., 2006) e espécies reativas de oxigênio (HURLEY et al., 2006), e o desenvolvimento desta afecção podal pode ser visto como consequência deste processo inflamatório afetando locais distantes, semelhante a falência orgânica no homem (BELKNAP et al., 2009). O modelo de injúria intestinal vem sendo utilizado, em outras espécies, como indutor de sepse, a qual está intrinsecamente relacionada à inflamação sistêmica (BENJAMIN, 2001), e pode, ainda, ocorrer pelas lesões de isquemia-reperfusão intestinal (BIANCO-BLATTLES et al., 2008), que provavelmente ocorreram durante a obstrução luminal dos animais deste experimento. FALEIROS et al., (2006) relataram, em quadro semelhante, que a distensão do cólon menor induz acúmulo pulmonar de neutrófilos.

As espécies reativas de oxigênio, liberadas por meio da injúria de isquemia-reperfusão são moléculas instáveis, desestruturando proteínas e carboidratos (HALLIWELL, 1989; CAMPOS & YOSHIDA, 2004), além de ativar as metaloproteinases (JOHNSON, 2004). Além disso, o estresse oxidativo gerado pode causar injúria à membrana mitocondrial, causando alteração da respiração

celular e, também, a ativação da apoptose (NATHAN & SINGER, 1999). Como existe um aumento desta substância em animais no período de desenvolvimento da laminite tanto em concentrações sistêmicas (HURLEY et al., 2006) como local, no tecido laminar (YIN et al., 2008), provavelmente exista relação da mesma com a laminite.

As lesões teciduais encontradas nos tecidos laminares destes equinos foram mais intensas do que as relatadas por RIO TINTO et al. (2004), possivelmente em função do período de 12 horas de reperfusão intestinal utilizadas por estes autores, o qual foi inferior às 18 horas aqui empregadas. Esses dados indicam que a gravidade das lesões laminares estão relacionadas ao tempo de ocorrência de injúria intestinal.

A ausência de diferença entre as lesões encontradas nos cavalos submetidos ao procedimento cirúrgico, porém sem obstrução (Gi), com aquelas dos grupos obstruídos (Gt e Gnt) demonstra que a realização da enterotomia pode deflagrar alterações do tecido laminar, ainda que menos intensas que as anotadas nos grupos obstruídos, uma vez que não houve diferenças entre as lesões do Gi com o grupo controle (Gc). Sabe-se que a laparotomia leva a redução da motilidade intestinal, provavelmente pela manipulação das alças durante a manobra cirúrgica, associada à liberação de prostaciclina (GOTTLIEB et al., 1989; FUKUDA et al., 2005), e predisposição à translocação bacteriana intestinal (REDDY et al., 2006), os quais estariam relacionados ao desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica, fato que justificaria as alterações laminares encontradas nos animais submetidos a enterotomia. HIKI et al. (2006) demonstraram que ocorre aumento significativo de citocinas inflamatórias e concentrações sistêmicas de endotoxinas em suínos submetidos à gastrectomia com o método tradicional, com manipulação intestinal quando comparado à animais submetidos à gastrectomia por laparoscopia e animais com laparotomia sem manipulação de alças. Diferente do que ocorre na medicina humana, foi constatado que na extremidade dos membros de equinos ocorre vasoconstrição

digital, mediada pela prostaciclina, descrito por MENZIES-GOW et al. (2008), sendo, talvez, uma também explicação plausível para as alterações morfológicas observadas.

Segundo POLLITT (1996), as alterações do tecido laminar classificadas com escore superior a 1 induzem sinais clínicos de laminite, e alterações como esta foram observadas em vinte e sete por cento dos equinos dos grupos experimentais, Gi, Gt e Gnt (escore 1,5). Considerando que a evolução da laminite secundária ao quadro de abdômen agudo transcorre entre 24 a 48 horas (WHITE, 1990), caso estes animais não fossem sacrificados no período de tempo de 18 horas de reperfusão intestinal, poderiam desenvolver alterações posturais e locomotoras características da enfermidade. No entanto é impossível afirmar que o quadro seria de laminite com sintomatologia clínica, e talvez estas alterações seriam sub-clínicas, pois apenas 25% dos animais com afecções gastrintestinais desenvolvem sinais clínicos de laminite (COHEN et al., 1994).

As alterações sutis (escore 0,5) observadas em alguns animais do grupo controle (15%) podem ser consideradas passíveis de ocorrer em animais normais, induzidas por processo inflamatório sistêmico de pequena gravidade.

A caspase 14 é uma enzima não apoptótica que participa da diferenciação celular dos queratinócitos, formando o extrato córneo da pele (HATHAWAY & KUECHLE, 2002). O tecido laminar tem origem epidérmica, e possivelmente poderia expressar esta caspase. Todavia, não houve imunomarcagem para a caspase 14 nos cortes histológicos, corroborando com os achados de FALEIROS et al. (2004) e SOUZA (2007), o que confirma sua inexistência no tecido laminar.

A fragmentação do núcleo formando os corpos apoptóticos caracteriza a apoptose, e ocorre pela ativação da DNAase nuclear por meio da caspase 3 (McILROY et al., 1999). A imunomarcagem para a caspase 3, denotando a presença de apoptose, foi observada nos cortes histológicos dos animais deste estudo, no entanto, o número de células imunomarcadas apresentou grande variabilidade até dentro do mesmo grupo. Este fato demonstra que durante a fase

inicial da lesão laminar não ocorre ativação excessiva das caspases, uma vez que os dados dos grupos submetidos aos procedimentos cirúrgicos (Gi, Gt e Gnt) não diferiram do grupo controle. A apoptose está presente nos tecidos normais de maneira fisiológica, como observado neste estudo e também nos achados de FALEIROS et al., (2004) e SOUZA (2007), provavelmente promovendo a renovação celular. FALEIROS et al. (2004) relataram aumento da taxa de apoptose em cavalos com laminite naturalmente adquirida, com até uma semana de evolução, quando comparados a animais no período prodrômico ou com laminite crônica. SOUZA (2007) observou aumento de células apoptóticas em equinos após 48 horas de indução da laminite. Desta forma, a ocorrência da apoptose deve estar associada à gravidade das lesões encontradas na laminite, evidentes no período mais tardio ao início do desenvolvimento da doença, quando já houve manifestação da sintomatologia clínica.

Em humanos, a apoptose apresenta ligação com lesões de isquemia, sendo detectada mais frequentemente durante o período de reperfusão (OLIVETTI et al., 1997). Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio e as MMPs, estimuladas pela injúria de isquemia e reperfusão, possam ativar a cascata de apoptose (CHEUNG et al., 2000).

O tecido laminar não exhibe a presença de edema e necrose, segundo POLLITT (2004), e como a apoptose é uma forma de morte celular que não desencadeia reação inflamatória local (MEAGHER et al., 1992; COHEN, 1993), seu aumento no tecido laminar de animais com sinais clínicos da doença, como observado por FALEIROS et al. (2004), explicaria a falência das CB que ocorre na fase prodrômica da laminite. Porém, tal fato não ocorreu neste trabalho.

Embora não se tenha elementos que suportem esta hipótese, poder-se-ia pensar que a ativação da cascata apoptótica possa estar relacionada a regeneração e renovação tecidual na laminite, como tentativa de se restabelecer a integridade estrutural do tecido laminar, considerando que as lesões teciduais

foram deflagradas sem sua participação e que esse evento ocorre no tecido normal, provavelmente com esta mesma função.

A maioria dos estudos tanto da medicina humana como veterinária utiliza técnicas de imunohistoquímica e zimografia para detecção de MMP-2 e 9 nos tecidos. O estudo imunohistoquímico apresenta a localização tecidual de cada MMP. Entretanto pode, às vezes, resultar em falso positivo baseado em reações cruzadas não específicas. Já a zimografia demonstra a ação proteolítica mais do que a antigenicidade e assim fornece medidas semi-quantitativas, além de distinguir as formas ativa e latente (pró-enzima) das MMPs (PEREIRA et al., 2006).

A imunomarcação foi específica para as MMPs. A marcação foi difusa na LES, corando o citoplasma das CB. Desta forma, a classificação foi baseada em MORALES et al (2007), estabelecendo escores para a intensidade de imunomarcação.

A expressão local das MMPs por meio da classificação empregada mostrou-se satisfatória para este fim, uma vez que houve aumento da intensidade de imunomarcação nos animais dos grupos com procedimento cirúrgico (Gi, Gt e Gnt) que era esperado devido às alterações morfológicas encontradas nestes animais. E estes achados foram respaldados pela resposta semelhante encontrada para a atividade enzimática destas proteases obtida pela técnica de zimografia.

Houve aumento da imunomarcação e atividade das formas latente e ativa da MMP-2 nos animais dos grupos Gt e Gnt, os quais apresentaram lesões laminares superiores aos animais normais do grupo controle. O grupo instrumentado apresentou valores intermediários de MMP-2 imumarcada, relacionada, desta forma, às alterações morfológicas observada nestes animais, com intensidade igualmente intermediária comparada aos demais grupos. Esse resultado foi semelhante aos resultados de KYAW-TANNER & POLLITT (2004) no tecido lesado pela indução experimental de laminite. Em estudo utilizando gelo

para prevenir a laminite, observou-se também relação da MMP-2 com as alterações, sendo que o casco que não desenvolveu a enfermidade não apresentou aumento da protease (VAN EPS & POLLITT, 2004). As MMPs estão associadas ao desenvolvimento da laminite pela degradação excessiva do colágeno na MB (POLLITT, 1994; MUNGALL et al., 2001). Os resultados da MMP-2 aqui vistos indicam que existe relação de dependência entre a intensidade das lesões laminares e o aumento da protease. Todavia, nem sempre se observa o aumento na fase prodrômica da laminite induzida (MUNGALL & POLLITT, 1999; LOFTUS et al., 2006; LOFTUS et al., 2007) ou na laminite naturalmente adquirida (LOFTUS et al., 2008), o que questiona sua real participação na patogenia da doença. Lesões musculares demonstram durante a fase inicial de inflamação aumento de ambas as MMPs, enquanto na fase de regeneração há redução da MMP-9 e concentrações permanentemente elevadas de MMP-2 (ZIMOWSKA, et al., 2008). Portanto, o aumento da MMP-2 em lesões teciduais pode estar relacionado, devido a sua expressão constitutiva, com a regeneração e renovação tecidual (COCHRANE et al., 1995; SEIFERT et al., 1996).

Equinos na fase prodrômica da laminite, induzida ou de ocorrência natural, possuem aumento de MMP-9 (MUNGALL & POLLITT, 1999; LOFTUS et al., 2006; LOFTUS et al., 2007). Os animais deste estudo também exibiram essa resposta, com elevação da MMP-9 nos grupos com injúria intestinal, tanto por meio da IHQ como da zimografia. Certos estudos encontraram aumento da forma latente, ou pró-enzima, da MMP-9 durante a fase de desenvolvimento da laminite (MUNGALL & POLLITT, 1999; LOFTUS et al., 2006; LOFTUS et al., 2008), no entanto, não foi observada diferença em relação à MMP-9 latente neste modelo, provavelmente pelo grande desvio padrão entre as amostras.

A MMP-9 tem sido associada ao desenvolvimento da injúria tecidual em vários órgãos, principalmente pela sua forte associação com a infiltração neutrofílica (LOFTUS et al., 2006; CHAKRABARTI et al., 2006; MIKAMI et al., 2009). Houve aumento significativo da forma de MMP-9 conjugada ao NGAL

(C\_MMP-9/NGAL), um composto associado a neutrófilos, o que suporta a participação da MMP-9 na resposta inflamatória. Todavia não foi observada relação de dependência entre esta protease e a intensidade das lesões teciduais, o que indica que a MMP-9 contribui para a patogênese da laminite, mas de forma secundária, uma vez que a enfermidade possui caráter multifatorial.

Não foi possível verificar a presença de leucócitos nos cortes do tecido laminar, pois para isso deveriam ser empregados outros métodos laboratoriais (BLACK et al., 2006; FALEIROS et al., 2008). Contudo, a presença da MMP-9 conjugada ao NGAL sugere que houve infiltração leucocitária nos animais dos grupos Gi, Gt e Gnt, pois esta substância tem sido relacionada à infiltração leucocitária tecidual sendo, inclusive, empregada como biomarcador de lesão tecidual e de neutrófilos (NIELSEN et al., 1996; HEMDAHL et al., 2006, GUPTA et al., 2007; BU et al., 2008; SMITH et al., 2008). Do mesmo modo, não houve expressão da mesma no grupo controle, os quais supostamente não possuem leucócitos ativados no tecido laminar (LOFTUS et al., 2006).

BLACK et al. (2006) analisando a microvasculatura dérmica do tecido laminar do casco de animais com laminite induzida por extrato de noqueira preta, observaram aumento no número de leucócitos, indicando similaridade com a falência orgânica que ocorre na sepse humana, onde a migração leucocitária desempenha papel lesivo significativo. Porém existem evidências de que o processo inflamatório que precede a doença é sistêmico, e não apenas local, com ativação de leucócitos sanguíneos (HURLEY et al., 2006).

A administração de glicocorticóides, em altas doses e por períodos prolongados leva ao desenvolvimento da laminite (JOHNSON et al., 2002) provavelmente devido à indução de resistência à insulina (TYLEI et al., 2007), ou redução da perfusão sanguínea do casco (CORNELISSE et al., 2006), como relatado por RYU et al (2004), em que um equino desenvolveu laminite aguda e hepatopatia pela administração de triamcilonona durante dez dias consecutivos. Considerando os achados deste estudo, não se pode concluir que a hidrocortisona

agravou as alterações morfológicas nos animais submetidos ao procedimento cirúrgico (Gt), pois não houve diferença com aquelas do grupo que não recebeu tratamento, corroborando com RIO TINTO et al. (2004).

ALJADA et al. (2001) observaram que a administração de hidrocortisona inibe a atividade das MMPs 2 e 9. Todavia, esse efeito só foi observado em relação a MMP-9 imunomarcada e a forma conjugada ao NGAL, os quais não foram diferentes do grupo controle, apresentando valores intermediários entre os grupos. Não foi possível observar efeito da hidrocortisona sobre a atividade da MMP-2, a qual foi semelhante entre todos os animais submetidos ao procedimento cirúrgico (Gi, Gt e Gnt).

A evolução da laminite, até o aparecimento dos sinais clínicos, normalmente varia de 24 a 48 horas em animais com síndrome cólica (WHITE, 1990), sem que necessariamente ocorra estabilização da lesão laminar. Desta forma, talvez o efeito da hidrocortisona, reduzindo as concentrações de MMP-9 e da possível infiltração leucocitária, pudesse ser visualizado numa fase mais tardia, considerando que as lesões pudessem ainda evoluir. Há, ainda, que se ponderar que talvez houvesse a necessidade de outra administração de hidrocortisona, pois sua meia-vida é menor que 12 horas, com duração de efeito de apenas 8 horas (BEHREND & KEMPPAINEN, 1997), para controlar efetivamente a ativação inflamatória desencadeada pela obstrução intestinal.

Estes resultados fornecem apenas indícios de que a hidrocortisona possa trazer benefício para a prevenção da laminite. Deve-se destacar que a administração deste corticosteroide não agravou as lesões teciduais, o que indica que ele possa ser administrado em equinos com afecções agravadas pela ativação sistêmica, com o intuito de coibir seus efeitos deletérios, como redução de mediadores inflamatórios e do estresse oxidativo (KAUFMANN et al., 2008).

## 8. CONCLUSÕES

O modelo de injúria intestinal por obstrução jejunal foi eficiente em reproduzir o quadro sistêmico presente nas afecções gastrintestinais necessário para a observação de alterações laminares, com consequente aumento das concentrações de metaloproteinases e provável infiltração leucocitária no tecido laminar.

A apoptose não apresenta envolvimento com as lesões laminares durante a fase inicial de desenvolvimento da doença.

A expressão de MMP-2 está relacionada à gravidade das alterações morfológicas do tecido laminar. Mas não é possível afirmar que tenha relação direta com a patogênese da laminite

A hidrocortisona reduz a expressão da MMP-9 no tecido laminar, principalmente relacionada a leucócitos. Sua administração não agravou as lesões do tecido laminar, tampouco a apoptose e a expressão de MMP-2, denotando segurança para utilizá-la na terapia de equinos acometidos por afecções gastrintestinais.

## 7. REFERÊNCIAS

ALJADA, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P.; HOFMEYER, D.; TRIPATHY, D.; DANDONA, P. Hydrocortisone suppresses intranuclear activator-protein-1 (AP-1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9). **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 12, p. 5988-5991, 2008.

ALLEN, D. J.; CLARK, E. S.; MOORE, J. N.; PRASSE, K. W. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 1930-1934, 1990.

ANDRADE JÚNIOR, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

ANNANE, D.; CAVAILLON, J. M. Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside? **Shock**, v. 20, p. 197-207, 2003.

ASPLIN, K. E.; SILLENCE, M. N.; POLLITT, C.; MCGOWAN, C. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 530-535, 2007.

BAILEY, S.R.; MENZIES-GOW, N.J.; HARRIS, P.A.; HABERSHON-BUTCHER, J.L.; CRAWFORD, C.; BERHANE, Y.; BOSTON, R.C.; ELLIOTT, J. Effect of dietary fructans and dexamethasone administration on the insulin response of ponies predisposed to laminitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.231, n.9, p.1365-1373, 2007.

BAILEY, S. R.; ADAIR, H. S.; REINEMEYER, C. R.; MORGAN, S. J.; BROOKS, A. C.; LONGHOFER, S. L.; ELLIOTT, J. Plasma concentration of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose-induced laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2008 (*in press*).

BEHREND, E. N.; KEMPPAINEN, R. J. Glucocorticoid therapy: pharmacology, indications, and complications. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 27, p. 187-213, 1997.

BELKNAP, J.; MOORE, J.N.; CROUSER, E.C. Sepsis – from human organ failure to lamellar failure. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2009 (*in press*)

BELKNAP, J.; GIQUERE, S.; PETTIGREW, A.; COCHRAN, A. M.; VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 1, p. 42-47, 2007.

BELKNAP, J. K.; BLACK, S. J. Review of the Pathophysiology of the developmental stages of equine laminitis. **American Association of Equine Practitioners**, Seattle, dez. 2005. Disponível em <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2005/belknap/chapter.asp?LA=1>> Acesso em: 31 out. 2008.

BENJAMIN, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 18-26, 2001.

BIANCO-BLATLLES, M. D.; SOSUNOV, A.; POLIN, R. A.; TEN, V. S. Systemic inflammation following hind-limb ischemia- reperfusion affects brain in neonatal mice. **Developmental Neuroscience**, v.30, n.6, p.367-373, 2008.

BLACK, S. J.; LUNN, D. P.; YIN, C.; HWANG, M.; LENZ, S. D.; BELKNAP, J. K. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, p. 161-166, 2006.

BOCCCELLINO, M., GIUBERT G., QUAGLIUOLO, L.; MARRA, M.; D'ALESSANDRO, A. M.; FUJITA, H.; GIOVANE, A.; ABBRUZZESE, A.; CARAGLIA, M. Apoptosis induced by interferon-alpha and antagonized by EGF is regulated by caspase-3-mediated cleavage of gelsolin in human epidermoid cancer cells. **Cell Physiology**, v. 201, n. 1, p. 71-83, 2004.

BOLIGNANO, D.; BASILE, G.; PARISI, P.; COPPOLINO, G.; NICOCIA, G.; BUEMI, M. Increased plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels predict mortality in elderly patients with chronic heart failure. **Rejuvenation Research**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2009.

BONE, R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. **Critical Care Medicine**, v. 24, n. 7, p. 1125-1128, 1996.

BOOSMAN, R.; MUTSAERS, C. W.; KLARENBECK, A. The role of endotoxin in the pathogenesis of acute bovine laminitis. **The Veterinary Quarterly**, v. 13, n. 3, p. 155-162, 1991.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, p. 3503–3521, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 248-254, 1976.

BRASIL, L. A.; GOMES, W. J.; SALOMAO, R.; FONSECA, J. H. P.; BRANCO, J. N. R.; BUFFOLO, E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 14, n. 3, p. 254-268, 1999.

BU, D.; HEMDAHL, A. L.; GABRIELSEN, A.; FUXE, J.; ZHU, C.; ERIKSSON, P.; YAN, Z. Q. Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in vascular injury via activation of nuclear factor-kB. **American Journal of Pathology**, v. 169, p. 2245-2253, 2006.

CAMPEBELL, R. C.; PEIRÓ, J. R.; ROSA, P. C. S.; VALADÃO, C. A. A.; BECHARA, G. H. Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em equinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 837-843, 2007.

CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 4, 2004.

CHAKRABARTI, S.; ZEE, J. M.; PATEL, K. D. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, p. 214-222, 2006.

CHEUNG, P. Y.; SAWICKI, G.; WOZNIAK, M.; WENJIE WANG; RADOMSKI, M. W.; SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. **Circulation**, v.101, p.1833-1839, 2000

COCHRANE, C. A.; FREEMAN, K. L.; KNOTTENBELT, D. C. Effect of growth factors on the characteristics of cells associated with equine wound healing and sarcoid formation. **Wound Repair and Regeneration**, v. 4, p. 58–65, 1996.

COHEN, J. J. Apoptosis. **Immunology Today**, v. 14, n. 3, p. 126-130, 1993.

COHEN, N. D.; PARSON, E. M.; SEAHORN, T. L.; CARTER, G. K. Prevalence and factors associated with development of laminitis in horses with duodenitis/proximal jejunitis: 33 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.204, p.250-254, 1994.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**. v.420, n.885-891, 2002

CORNELISSE, C. J.; ROBINSON, N. E.; BERNEY, C. A.; EBERHART, S.; HAUPTMAN, J. E.; DERKSEN, F. J. Thermographic study of *in vivo* modulation of vascular responses to phenylephrine and endothelin-1 by dexamethasone in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 2, p. 119-126, 2006.

CREAGH, E. M.; CONROY, H.; MARTIN, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological Reviews**, v. 193, p. 10–21, 2003.

CROSER, E. L.; POLLITT, C. C. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. **American Association of Equine Practitioners**, Santo Antonio, dez. 2006. Disponível em <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2006/croser/chapter.asp?LA=1>> Acesso em: 10 jan. 2009.

DENMEADE, S. R., ISAACS, J. T. Programmed cell death (apoptosis) and cancer chemotherapy. **Cancer Control Journal**, v. 3, n. 4 p. 1-10, 2005.

DIVERS, T. J. Prevention and treatment of thrombosis, phlebitis, and laminitis in horses with gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v. 19, n. 3, p. 779-790, 2003.

DUNCAN, S. J.; MEYERS, K. M.; REED, S. M.; GRANT, B. Alterations in coagulation and hemograms of horses given endotoxins for 24 hours via hepatic porta infusions. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 6, p. 1287-1293, 1985

EADES, S. C.; HOLM, A. M. S.; MOORE, R. M. A Review of the pathophysiology and treatment of acute laminitis: pathophysiologic and therapeutic implications of endothelin-1. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v. 48, p. 353-361, 2002.

EADES, S. C.; STOKES, A. M.; JOHNSON, P. J.; LEBLANC, C. J.; GANJAM, V. K.; BUFF, P. R.; MOORE, R. M. Serial alterations in digital hemodynamics and endothelin-1 immunoreactivity, platelet-neutrophil aggregation, and concentrations of nitric oxide, insulin glucose obtained from horses following carbohydrate overload. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 87–94, 2007.

ECKHART, L.; DECLERCQ, W.; BAN, J.; RENDL, M.; LENGAUER, B.; MAYER, C.; LIPPENS, S.; VANDENABEELE, P.; TSCHACHLER, E.; Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 6, p. 1148-1151, 2000.

FALEIROS, R. R. **Obstrução experimental do cólon menor equino: aspectos clínicos, patológicos e terapêuticos**.168f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

FALEIROS, R. R.; MACORIS D. G.; ALESSI A. C.; SAQUETTI C. H.; RASERA L. Effect of intraluminal distention on microvascular perfusion in the equine small colon. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 1292-1297, 2002.

FALEIROS, R. R.; STOKES, A. M.; EADES, S. C.; KIM, D. Y.; PAULSEN, D. B.; MOORE, R. M. Assessment of apoptosis in epidermal lamellar cells in clinically normal horses and those with laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 5, p. 578-585, 2004.

FALEIROS, R. R.; MACORIS, D. G. ; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; MOORE, R. M. Acúmulo pulmonar de neutrófilos decorrente de distensão do cólon menor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. suppl. 2, p. 75-75, 2006.

FALEIROS, R. R.; NOUVO, G. J.; BELKNAP, J. K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 1, p.174-181, 2009.

FLOWER, D. R. The lipocalin protein family: structure and function. **Biochemistry Journal**, v. 318, p. 1-14, 1996.

FRENCH, R. K.; POLLITT, C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: a ultrastructural study. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 3, p. 230-236, 2004.

FUKUDA, H.; TSUCHIDA, D.; KODA, K.; MIYASAKI, M.; PAPPAS, T. N. Takahashi, T. Impaired gastric motor activity after abdominal surgery in rats. **Neurogastroenterology Motility**, v. 17, n. 2, p. 245-250, 2005.

GALEY, F. D.; TWARDOCK, A. R.; GOETZ, T. E.; SCHAEFFER, D. J.; HALL, J. O.; BEASLEY, V. R. Gamma scintigraphic analysis of the distribution of perfusion of blood in the equine foot during black walnut (*Juglans nigra*)- induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 688–695, 1990.

GARNER, H. E.; COFFMAN, J. R.; HAHN, A. W.; HUTCHESON, D. P.; TUMBLESON, M. E. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 441-445, 1975.

GEOR, R.; FRANK, N. Metabolic syndrome—From human organ disease to laminar failure in equids. **Immunology and Immunopathology**, 2008 (*in press*).

GOTTLIEB, A.; SKRINSKA, V. A.; O'HARA, P.; BOUTROS, A. R.; MELIA, M.; BECK, G. J. The role of prostacyclin the mesenteric traction syndrome during anesthesia for abdominal aortic reconstructive surgery. **Annals of Surgery**, v. 209, n. 3, p. 363-367, 1989.

GUPTA, K.; SHUKLA, M.; COWLAND, J. B.; MALEMUD, C. J.; HAQQ, T. M. Neutrophil gelatinase–associated lipocalin is expressed in osteoarthritis and forms a complex with matrix metalloproteinase 9. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 10, p. 3326-3335, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 70; p. 737-5, 1989.

HAN, Y.; TUAN, T. L. TNF- $\alpha$  stimulates activation of pro-MMP-2 in human skin through NF- $\kappa$ B mediated induction of MT1-MMP. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 131-139, 2000.

HAN, T.; TUAN, T.; HUGHES, M.; WU, H.; GARNER, W. L. Transforming growth factor-b- and tumor necrosis factor-amediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22341-22350, 2001.

HASLETT, C.; SAVILL, J. Why is apoptosis important to clinicians? **British Medical Journal**, v. 322, p. 1499, 2001.

HATHAWAY, T. R.; KUECHLE.; M. K. Apoptosis and cutaneous biology. **Advanced Dermatololy**, v. 18, p. 287-311, 2002.

HEMDAHL, A.L.; GABRIELSEN, A.; ZHU, C.; ERIKSSON, P.; HEDIN, U.; KASTRUP, J.; THORÉN, P.; HANSSON, G.K. Expression of neutrophil gelatinase-

associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.26, n.1., v.136-142, 2006

HERMAN, S.; ZURGIL, N.; DEUTSCH, M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. **Inflammation Research**, v. 54, n. 7, p. 273-280, 2005.

HIKI, N.; SHIMIZU, N.; YAMAGUCHI, H.; IMAMURA, K.; KAMI, K.; KUBOTA, K.; KAMINISHI, M. Manipulation of the small intestine as a cause of the increased inflammatory response after open compared with laparoscopic surgery. **British Journal of Surgery**, v. 96, p. 195-204, 2006.

HOOD, D. M.; AMOSS, M. S.; HIGHTOWER, D. Equine laminitis I: radioisotopic analysis of the hemodynamics of the foot during the acute disease. **Journal of Equine Medicine and Surgery**, v. 2, p. 439-444, 1978.

HOOD, D.M. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.15, n.2, p.325-343, 1999.

HOTCHKISS, R. S.; NICHOLSON, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. **Immunology**, v. 6, p. 813-822, 2006.

HUNT, R. J. ALLEN, D.; MOORE, R. J. Effect of endotoxin administration on equine digital hemodynamics and Starling forces. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 1703-1707, 1990.

HURLEY, D. J.; PARKS, R. J.; REBER, A. J.; DONOVAN, D. C.; OKINAGA, T.; VANDENPLAS, M. L.; PERONI, J. F.; MOORE, J. N. Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3-4, p. 195-206, 2006.

HUTLEY, L.; PRINS, J. B. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 330, p. 280-289, 2005.

JOHNSON, P. J. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v. 18, n. 2, p. 271-293, 2002.

JOHNSON, P. J.; TYAGI, S. C.; KATWA, L. C.; GANJAM, V. K.; MOORE, L. A.; KREEGER, J. M.; MESSER, N. T. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. **The Veterinary Records**, v. 142, p. 392-396, 1998.

JOHNSON, P. J.; SLIGHT, S. H.; GANJAM, V. K.; KREEGER, J. M. Glucocorticoids and laminitis in the horse. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v. 18, n. 2, p. 219-236, 2002.

JOHNSON, P. J.; BOWLES, D. K.; MESSER, N. T. Dexamethasone alters equine digital artery smooth muscle ion channel activity and contractility: Role in glucocorticoid associated laminitis? **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 457-458, 2003.

KAUFMANN, I.; BRIEGEL, J.; SCHLIEPHAKE, F.; HOELZL, A.; CHOUKER, A.; HUMMEL, T.; SCHELLING, G.; THIEL, M. Stress doses of hydrocortisone in septic shock: beneficial effects on opsonization-dependent neutrophil functions. **Intensive Care Medicine**, v. 34, n. 2, p. 344-349, 2008.

KEEN, J. A.; HILLIER, C.; MCGORUM, B. C.; NALLY, J.E. Endothelin mediated contraction of equine laminar veins. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 50, p. 488-492, 2008.

KUECHLE, M. K.; PREDD, H. M.; FLECKMAN, P.; DALE, B. A.; PRESLAND, R. B. Caspase-14, a keratinocyte specific caspase: mRNA splicing variants and expression pattern in embryonic and adult mouse. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, p. 868-870, 2001.

KYAW-TANNER, M.; POLLITT, C. C. Equine laminitis: increased transcription of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) occurs during the developmental phase. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 3, p. 221-225, 2004.

LOFTUS, J. P.; BELKNAP, J. K.; BLACK, S. J. Matrix metalloproteinase-9 in laminae of black walnut extract treated horses correlates with neutrophil abundance. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 267-276, 2006.

LOFTUS, J. P.; BLACK, S. J.; PETTIGREW, A.; ABRAHANSEN, E. J.; BELKNAP, J. K. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 11, p. 1205-1211, 2007.

LOFTUS, J. P.; JOHNSON, P. J.; BELKNAP, J. K.; PETTIGREW, A.; BLACK, S. J. Leukocyte-derived and endogenous matrix metalloproteinases in the lamellae of horses with naturally acquired and experimentally induced laminitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, 2008 (*in press*).

LORENCINI, M., SILVA, J. A.; DE LA HOZ, C. L.; CARVALHO, H. F.; STACH-MACHADO, D. R. Changes in MMPs in inflammatory cells in experimental gingivitis. **Histology and Histopathology**, v. 24, n. 2, p. 157-166, 2009.

MADESH, M.; HAWKINS, B. J.; MILOVANNOVA, T.; BHANUMATHY, C. D.; JOSEPH, S. K.; RAMACHANDRARAO, S. P.; SHARMA, K.; KUROSAKI, T.; FISHER, A. B. Selective role for superoxide in InsP<sub>3</sub> receptor-mediated mitochondrial dysfunction and endothelial apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 170, n. 7, p. 1079-1090, 2005.

MARTINS FILHO, L. P.; FAGLIARI, J. J.; MORAES, J. R. E.; SAMPAIO, R. C.; OLIVEIRA, J. A.; LACERDA NETO, J. C. Influência da heparina sódica na ocorrência de laminite eqüina induzida por sobrecarga de carboidratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1358-1366, 2008.

McILROY, D.; SAKAHIRA, H.; TALANIAN, R. V.; NAGATA, S. Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. **Oncogene**, v. 18, n. 31, p. 4401-4408, 1999.

MEAGHER, L. C.; SAVILL, J. S.; BAKER, A.; FULLER, R. W.; HASLETT, C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B<sub>2</sub>. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 52, n. 3, p. 269-273, 1992.

MENZIES-GOW, N. J.; BAILEY, S. R.; BERHANE, Y.; BROOKS, A. C.; ELLIOTT, J. Evaluation of the induction of vasoactive mediators from equine digital vein endothelial cells by endotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 3, p. 349-355, 2008.

MIKAMI, Y.; DOBSCHUTZ, E. V.; SOMMER, O.; WELLNER, U.; UNNO, M.; HOPT, U.; KECK, T. Matrix metalloproteinase-9 derived from polymorphonuclear neutrophils increases gut barrier dysfunction and bacterial translocation in rat severe acute pancreatitis. **Surgery**, v. 145, n. 2, p. 147-156, 2009.

MILINOVICH, G. J.; TROTT, D. J.; BURRELL, P. C.; CROSER, E. L.; JASSIM, R.A.M.A.; MORTON, J.M.; VAN EPS, A.W.; POLLITT, C. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. **Environmental Microbiology**, v. 9., n. 8, p. 2090-2100, 2007.

MOORE, J. N.; BELKNAP, J. K. You say lamellae, I say laminae. Let's call...An overview of the Havemeyer Workshop on laminitis pathophysiology. **Veterinary Immunology Immunopathology**, 2008 (*in press*).

MORALES, D. S. R.; PENIDO, N. O.; SILVA, I. D. C. G.; STÁVALE, J. N.; GUILHERME, A.; FUKUDA, Y. Matriz metaloproteinase 2: um importante marcador genético para colesteatomas. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 1, p. 55-61, 2007.

MUNGALL, B. A.; POLLITT, C. C. Zymographics analysis of equine laminitis. **Histochemistry and cell biology**, v. 112, n. 6, p. 467-472, 1999.

MUNGALL, B. A.; KYAW-TANNER, M.; POLLITT, C. C. *In vitro* evidence for a bacterial pathogenesis of equine laminitis. **Veterinary Microbiology**, v. 79, p. 209-223, 2001.

NATHAN, A. G.; SINGER, M. The oxygen trail: tissue oxygenation. **Br Med Bull** v. 55, p. 96 – 108, 1999.

NGUYEN, H. X.; O'BARR, T. J.; ANDERSON, A. J. Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF-alpha. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 3, p. 900-912, 2007.

NICHOLSON, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 6 p. 1028–1042, 1999.

NIELSEN, B. S.; BORREGAARD, N.; BUNDGAARD, J. R.; TIMSHEL, S.; SEHESTED, M.; KJELDSEN, L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 38, p. 414-420, 1996.

NOSCHKA, E.; MOORE, J. N.; PERONI, J. F.; LEWIS, S. J.; MORROW, J. D.; ROBERTSON, T. P. Thromboxane and isoprostanes as inflammatory and vasoactive mediators in black walnut heartwood extract induced equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2008 (*in press*).

NOSCHKA, E.; VANDENPLAS, M. L.; HURLEY, D. J.; MOORE, J. N. Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, 2009. (*in press*).

NOURIAN, A. R.; BALDWIN, G. I.; VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24-30 hours after induction with oligofructose. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 4, p. 360-364, 2007.

PARSONS, C. S.; ORSINI, J. A.; KRAFTY, R.; CAPEWELL, L.; BOSTON, R. Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization: 73 cases (1997-2004). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 6, p. 885-889, 2007.

PERONI, J. F.; MOORE, J. N.; NOSCHKA, E. et al. Predisposition for venoconstriction in the equine lamellar dermis: implications in equine laminitis. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, p. 759-763, 2006

PERONI, J. F.; HARRISON, W.E.; MOORE, J. N. et al. Black walnut extract-induced laminitis in horses is associated with heterogeneous dysfunction of the lamellar microvasculature. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 6, p. 546-551, 2005

ODROWAZ-SYPNIEWSKA, G. Markers of pro-inflammatory and prothrombotic state in the diagnosis of metabolic syndrome. **Advanced Medical Science**, v. 52, p. 246–250, 2007.

OLIVETTI, G.; ABBI, R.; QUAINI, F. et al. Apoptosis in the failing human heart. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 16, p. 1131-1141, 1997

PEREIRA, A. C.; CARMO, E. D.; SILVEIRA, V. A. S.; AMADEI, S. U.; ROSA, L. E. B. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 3, p. 257-262, 2006.

POLLITT, C. C. The basement membrane at the equine hoof dermal epidermal junction. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 5, p. 399-407, 1994.

POLLITT, C. C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, n. 1, p. 38-46, 1996.

POLLITT, C. C.; Equine laminitis: a revised pathophysiology. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v. 45, p. 188-192, 1999.

POLLITT, C. C. Pathophysiology of laminitis. In: DYSON, S.J.; ROSS, M.W. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Saunders, 2003. p. 325 – 329.

POLLITT, C. C. Equine Laminitis. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 3, n. 1, p. 34-44, 2004.

POLLITT, C. C. Update on the pathophysiology of laminitis. **American Association of Equine Practitioners**, Geneva, dez. 2007. Disponível em <[http://www.ivis.org/proceedings/geneva/2007/p012\\_017\\_Pollitt.pdf](http://www.ivis.org/proceedings/geneva/2007/p012_017_Pollitt.pdf)> Acesso em: 3 mar. 2009.

POLLITT, C. C.; DAVIES, C. T. Equine laminitis: its development coincides with increased sublamellar blood flow. **Equine Veterinary Journal**, suppl. 26, p. 125-132, 1998.

POLLITT, C. C.; DARADKA, M. Equine laminitis basement membrane pathology: loss of type IV collagen, type VII collagen and laminin immunostaining. **Equine Veterinary Journal**, suppl 26, p. 139-144, 1998.

POLLITT, C. C.; VAN EPS A. W. Equine laminitis; a new induction model based on alimentary overload with fructan. **Internacional Equine Colic Research Symposium**, v. 7, p. 87, 2002.

REDDY, B. S.; GATT, M.; SOWDI, R.; MacFIE, J. Surgical manipulation of the large intestine increases bacterial translocation in patients undergoing elective colorectal surgery. **Colorectal Disease**, v. 8, p. 596-600, 2006.

REININGER, A.; KORNDÖRFER, M. A.; WURZINGER, L. J. Adhesion of ADP-activated platelets to intact endothelium under stagnation point flow in vitro is mediated by integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . **Thrombosis and Haemostasis**, v. 70, p. 998-1003, 1998.

RIGGS, L. M.; FRANCK, T.; MOORE, J. N.; KRUNKOSKY, T. M.; HURLEY, D. J.; PERONI, J. F.; DE LA REBIERE, G.; SERTEYN, D. A. Neutrophil myeloperoxidase measurements in plasma, lamellar tissue, and skin of horses given black walnut extract. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 81-86, 2007.

RIO TINTO, J. J. M.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R.; SANTOS, R. L.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; MELO, E. G. Utilização de hidrocortisona em equinos submetidos a isquemia e reperfusão no jejuno e suas conseqüências sob o cório laminar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, 292-299, 2004.

ROBERTSON, T. P.; BAILEY, S. R.; PERONI, J. F. Equine laminitis: a journey to the dark side of venous. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2008 (*in press*).

RYU, S.; KIM, B.; LEE, C.; YOON, J.; LEE, Y. Glucocorticoide-induced laminitis with hepatopathy in a thoroughbred filly. **The Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 3, p. 271-274, 2004.

SEIFERT, W. F.; WOBBER, T.; HENDRIKS, T. Divergent patterns of matrix metalloproteinase activity during wound healing in ileum and colon of rats. **Gut**, v. 39, p. 114-119, 1996.

SHAPIRO, N. I.; TRZECIAK, S.; HOLLANDER, J. E.; BIRKHAHN, R.; OTERO, R.; OSBORN, T. M.; MORETTI, E.; NGUYEN, H. B.; GUNNERSON, K. J.; MILZMAN, D.; GAIESKI, D. F.; GOYAL, M.; CAIRNS, C. B.; NGO, L.; RIVERS, E. P. A prospective, multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 1, p. 96-104, 2009.

SHOELSON, S. E.; LEE, J. GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, 2006

SINGER, G., GRANGER, D. N. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. **Microcirculation**, v. 14, p. 375–387, 2007.

SMITH, E. R.; ZURAKOWSKI, D.; SAAD, A.; SCOTT, R. M.; MOSES, M. A. Urinary biomarkers predict brain tumor presence and response to therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 8, p. 2378-2386, 2008.

SOUZA, A. H.; VALADÃO, C. A. A.; CHIRGWIN, S.; STOKES, A. M.; MOORE, R. M. Transcription of MMP-2 and MMP-9 in horses with CHO-induced laminitis treated with an intracecal bufferin solution. **American Association of Equine Practitioners**, Santo Antônio, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2006/souza/chapter.asp?LA=1>> Acesso em: 30 jan. 2008

SOUZA, A.H. **Aspectos clínico, fisiopatológico e terapêutico na laminite experimental em equinos**. 2007. 219f. Tese (doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007

STETLER-STEVENSON, W. G. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 9, n. 4, p. 289-303, 1990.

STEWART, A. J.; PETTIGREW, A.; COCHRAN, A. M.; BELKNAP, J. K. Indices of inflammation in the lung and liver in the early stages of the black walnut extract model of equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2008 (*in press*)

SWENSON, C.; SWARD, L.; KARLSSON, J. Cryotherapy in sports medicine. **Scandinavia Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 6, p. 193–200, 1996.

TARNAWSKI, A. S.; SZABO, I. Apoptosis-programmed cell death and its relevance to gastrointestinal epithelium: survival signal from the matrix. **Gastroenterology**, v. 120, p. 294-299, 2001.

TILEY, H. A.; GEOR, R. J.; McCUTCHEON, L.J. Effects of dexamethasone on glucose dynamics and insulin sensitivity in healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 7, p. 753-759, 2007.

VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Equine laminitis: cryotherapy reduces the severity of the acute lesion. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 3, p. 255-260, 2004.

VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Equine laminitis induced with oligofructose. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, p. 203–208, 2006.

VENUGOPAL C. S.; HOLMES E. P, KOCH C. E. et al. In vitro pharmacologic effect of two endothelin-1 antagonists on equine colonic arteries and veins. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 154-159, 2001

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

WESS, D. J.; TRENT, A. M.;JOHNSTON, G. Prothrombotic events in the prodromal stages of acute laminitis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 8, p. 986-991, 1995.

WHITE, N. A. Intensive care, monitoring, and complications of acute abdominal disease. In: WHITE, N.A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea & Febiger Press, 1990. p.309 – 335.

WORSTER, A. A.; GAUGHAN, E. M.; HOSKINSON, J. Effects of external thermal manipulation on laminar temperature and perfusion of the equine digit. **American Association of Equine Practitioners Proceeding**, v. 47, p. 329-333, 2001.

YIN, C.; PETTIGREW, A.; LOFTUS, P. J.; BLACK, S. J.; BELKNAP, J. K. Tissue concentrations of 4-HNE in the black walnut extract model of laminitis: Indication of oxidant stress in affected laminae. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2008 (*in press*)

ZIMOWSKA, M.; BRZOSKA, E.; SWIERCSYNKA, M.; STREMINSKA, W.; MORACZEWSKI, J. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. **Internacional Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 307-314, 2008.