

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

EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES E
MORFOLOGIA DO TECIDO LAMINAR DO CASCO DE
EQUINOS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTRA-LUMINAL
DO CÓLON MENOR

Vinícius Athaydes Canello

Médico Veterinário

JABOTICABAL

2013

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

EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES E
MORFOLOGIA DO TECIDO LAMINAR DO CASCO DE
EQUINOS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTRA-LUMINAL
DO CÓLON MENOR

Vinícius Athaydes Canello

Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

Co-orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia de Lima Sampaio

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

JABOTICABAL

2013

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VINÍCIUS ATHAYDES CANELLO – nasceu na cidade de Pitangueiras. SP, no dia 27 de janeiro de 1988, filho de Júlio César Silva Canello e Rosa Maria Athaydes Canello. Em janeiro de 2011 graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Maringá, *campus* de Umuarama. Em março de 2011 ingressou no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, no curso de mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, câmpus de Jaboticabal.

DEDICATÓRIA

A minha querida mãe, Rosa Maria Athaydes Canello (*in memoriam*) por todo amor e carinho incondicional, por sempre me ensinar o valor dos estudos e a nunca desistir, pelo exemplo de vida, força e determinação que sempre foi para nós, nossa batalhadora. Em meu coração sempre carregarei você e tudo o que me ensinou, minha eterna Mamucha.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida, me concedendo força e determinação nos momentos de dificuldade, e conforto frente às perdas irreparáveis da vida. Não permitindo que eu desistisse de meu caminho e de meus sonhos.

A meu orientador prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto, por ter me aceito como seu orientado. Sempre presente, atencioso, dedicado e paciente. Por todos os conselhos profissionais e pessoais, e pela grande oportunidade de fazer parte de sua equipe, o que me levou a um amadurecimento profissional e pessoal incalculável. Ao senhor, grande profissional, a quem tenho muita admiração.

Ao prof. Dr. Mário Roberto Hatayde, por todo apoio, durante toda minha graduação e mestrado, e por todas as oportunidades que me proporcionou, sendo sempre atencioso e dedicado. Meu sincero e eterno agradecimento ao senhor, a quem sempre tive uma grande admiração.

A Kamila Gravena por toda ajuda desde o início, sempre com muita paciência, esclarecendo minhas dúvidas e me auxiliando na realização de nosso experimento. Por toda amizade e apoio durante estes dois anos.

A Prof. Dra. Lina Maria Wehrle Gomide pelo auxílio e amizade durante estes dois anos. Por todo o conhecimento proporcionado, e por toda ajuda em nosso experimento e na elaboração e correção deste trabalho.

A prof. Dra. Deborah Penteado Martins Dias por toda amizade e ajuda em nosso experimento, e por todo auxílio na elaboração e correção deste trabalho.

A Cristina Hernandez por toda ajuda em nosso experimento, pelos conselhos e acima de tudo pela amizade durante estes dois anos.

Ao prof. Dr. Júlio Carlos Canola, por toda ajuda com as análises radiográficas e por ter aceitado fazer parte de minha banca de qualificação.

Ao prof. Dr. José Jurandir Fagliari, coordenador do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, sempre disposto a ajudar nos momentos em que dele precisei.

A prof. Dra. Gisele Fabrino Machado, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar minhas análises zimográficas, e a seu orientado Guilherme Dias de Melo que me ensinou e auxiliou na realização destas análises. E a Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-Unesp, que autorizou o uso de suas instalações.

A meus irmãos Júlio e Vivian por todo apoio, carinho e amizade, pelos conselhos nos momentos de dúvida, e pela união durante os momentos de dificuldade.

A minha família que sempre esteve ao meu lado durante toda minha vida, sempre me apoiando, aconselhando e torcendo por minhas conquistas. Por todo carinho e amor que sempre recebi de vocês.

A minha namorada Maíra Bianchi Rodrigues Alves por todo apoio, companheirismo e compreensão, durante estes anos, sempre ao meu lado durante todas as dificuldades, sempre me incentivando e torcendo por mim.

A meus grandes amigos e colegas de trabalho, André Desjardins Antunes, Álvaro de Oliveira Paiva Neto, Matheus Henrique, Nara Saraiva Bernardi, por todos os momentos muito agradáveis que passamos na faculdade e também fora dela.

Aos funcionários do Hospital Veterinário Roberto Bertanha, Edson Giangreco, Laerte, Beto, Fábio, Deco, Arildo, Dalva, Sirlene, Juliana, por toda amizade e ajuda, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos Funcionários da Patologia Tel, Francisca e Edgar, por toda ajuda durante nosso experimento e confecção de material para análise.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter me concedido a bolsa de estudos, sem a qual não seria possível a realização de meu mestrado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que tornou possível a realização de nosso experimento, através de auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Considerações sobre o dígito equino	2
2.2. Suprimento sanguíneo do dígito equino	4
2.3. Crescimento da parede do casco	5
2.4. Histologia do casco.....	6
2.5. Biópsia do casco.....	7
2.6. Síndrome cólica e laminite equina	8
2.7. Metaloproteinases 2 e 9.....	11
3.OBJETIVOS.....	14
3.1. Gerais	14
3.2. Específicos	14
4.MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Animais.....	15
4.2. Biópsia de Casco.....	15
4.3. Celiotomia mediana transumbilical e obstrução intraluminal do cólon descendente em equinos.....	18
4.4. Cuidados pós-cirúrgicos.....	20
4.5. Análise histológica.....	20
4.6. Análise zimográfica das metaloproteinases 2 e 9.....	21
4.7. Análises estatísticas.....	24
5.RESULTADOS	25
5.1. Análises histológicas.....	25
5.2. Análise zimográfica.....	30

6.DISSCUSSÃO.....33
7.CONCLUSÃO38
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....39

EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES E MORFOLOGIA DO TECIDO LAMINAR DO CASCO DE EQUINOS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTRALUMINAL DO CÓLON MENOR

RESUMO – Diferentes estudos foram realizados buscando relacionar a ocorrência de distúrbios gastrointestinais e a manifestação da laminite. Neste contexto, destacou-se a participação de processos inflamatórios e sua relação com a expressão de metaloproteinases (MMP), que sabidamente promovem a degradação da membrana basal no tecido laminar do casco. O presente estudo objetivou avaliar a expressão das MMP-2 e MMP-9 no tecido laminar, bem como sua integridade celular por avaliação histológica, em equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. Oito equinos adultos hípidos foram avaliados. Realizou-se laparotomia e obteve-se obstrução do cólon menor utilizando-se balão de vinil inserido no lúmen intestinal. O balão foi inflado à pressão de 80 mmHg e a obstrução foi mantida por 4 horas, simulando a presença de um enterólito. Foram realizadas biópsias pelo acesso transmural-dorsal para obtenção de tecido laminar podal em três momentos (T): antes da obstrução (T0), imediatamente após desobstrução (T4) e após 72 horas da desobstrução (T72). As amostras foram submetidas à análise zimográfica e histológica. Segundo a zimografia, não observou-se alterações nos valores de MMP-2 e MMP-9 em T4 e T72. Entretanto, observou-se o surgimento de lesões no tecido laminar analisado microscopicamente (T4 e T72). Concluiu-se que as alterações inflamatórias decorrentes da obstrução do cólon menor levaram ao surgimento de lesões no tecido laminar podal. Porém, a inflamação promovida não foi suficiente para ocasionar alteração na expressão das MMP-2 e MMP-9 no tecido avaliado.

Palavras-chave: Biópsia podal, casco, cólica, inflamação, laminite, metaloproteinases

METALLOPROTEINASES' EXPRESSION AND MORPHOLOGY OF LAMINAR HOOF TISSUE OF HORSES SUBMITTED TO INTRALUMINAL OBSTRUCTION OF SMALL COLON

ABSTRACT - A number of studies have been conducted in order to relate gastrointestinal disorders and laminitis occurrence in horses. In this issue, special attention has been given to the role of inflammatory process and its relation with metalloproteinase (MMP) expression, which may lead to basement membrane degradation in the hoof laminar tissue. The purpose of the present study was to investigate MMP-2 and MMP-9 expression in the laminar tissue, as well as its cellular integrity assessed histologically, in horses subjected to intraluminal obstruction of the small colon. Eight healthy horses were evaluated. A laparotomy was performed and the small colon obstruction was achieved by the use of a vinyl ball inserted into the intestinal lumen. The ball was insufflated at 80 mmHg and the obstruction was sustained for 4 hours, mimicking an enterolithiasis. Through a dorsal-transmural access, podal laminar tissue samples were biopsied at three time-points: before obstruction (T0), immediately after desobstruction (T4) and after 72 hours from desobstruction. Samples were subjected to zymographic and histological analysis. The zymography did not reveal changes in MMP-2 and MMP-9 values at T4 and T72. However, microscopic evaluation showed laminar tissue lesions (T4 and T72). In conclusion, the inflammatory changes followed by the small colon obstruction led to podal laminar tissue damage. However, the inflammation was not sufficient to induce changes in MMP-2 and MMP-9 expression in the evaluated tissue.

Key words: Podal biopsy, hoof, colic, inflammation, laminitis, metalloproteinases

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de quase 70 milhões de anos de evolução o dígito do equino passou por diversas transformações, tornando-se uma estrutura complexa e resistente, adaptada aos mais diversos ambientes e tipos de terrenos. Entretanto, os mais de seis mil anos de domesticação foram suficientes para que as mudanças de hábitos impelidas pelo homem tornassem o casco mais susceptível às afecções.

A busca pelas causas da laminite equina, uma afecção aparentemente multifatorial, tem sido alvo de inúmeros estudos, entre os quais destacaram-se tentativas de estabelecimento da relação entre a ocorrência de distúrbio gastrointestinal e a manifestação da laminite.

Por longo período acreditou-se que esta relação fosse estabelecida inicialmente pelas endotoxinas. Entretanto, embora administrações experimentais de endotoxinas fossem capazes de produzir quadro de dor abdominal semelhante ao observado em casos de cólica, não promoviam o desenvolvimento da laminite, independentemente da dose administrada.

Recentemente, demonstrou-se que alterações associadas à laminite poderiam ocorrer em razão de disfunções metabólicas. Em paralelo, protocolos experimentais de laminite induzida destacaram a participação de processos inflamatórios na gênese da afecção, relacionando principalmente a expressão e ativação das MMPs 2 e 9. Tais MMPs são endopeptidases cálcio e zinco dependentes, relacionadas com a degradação da membrana basal dos tecidos laminares do casco.

Desta forma, considerando a importância das alterações ocasionadas pela resposta inflamatória induzida pelos distúrbios gastrointestinais, assim como a ligação desta resposta ao desenvolvimento da laminite, a comunidade científica busca, já há algum tempo, estabelecer os elos desta corrente que liga cólica e laminite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações sobre o dígito equino

A evolução dos membros dos equídeos foi de grande importância para a sobrevivência da espécie, durante a qual seus dígitos foram envolvidos por cascos queratinizados, rígidos e muito resistentes, localizados distalmente em membros relativamente leves, permitindo a estes animais a capacidade de desenvolver grande velocidade, essencial para sua defesa contra predadores (POLLITT, 2004a).

Apesar da bioengenharia quase perfeita do casco equino, quando este animal foi submetido às exigências da domesticação humana, o casco se tornou local de grande ocorrência de lesões (POLLITT, 1990). Tais distúrbios encontram-se associados a alterações na base de sua alimentação e à realização de atividade física em excesso, nas mais variadas condições e tipos de terrenos (JONES, 1987).

Considera-se que o casco protege as estruturas encontradas em seu interior e inicia a dissipação das forças concussivas geradas pelo impacto da extremidade do membro contra o solo (STASHAK, 2006). O casco é dividido em muralha, perioplo, sola e ranilha. O perioplo constitui a faixa de poucos milímetros de espessura, constituído por tecido córneo macio de consistência elástica e queratina tubular e intertubular, localizada logo abaixo da borda coronária. A partir do qual o casco cresce em direção à face solear. O perioplo reveste os bulbos dos talões e se mistura com a base da ranilha, protegendo-os da umidade e da entrada de microrganismos e corpos estranhos. A sola também é composta por tecido córneo tubular e intertubular, preenchendo o espaço entre a parede e a ranilha. Sendo levemente côncava, o contato do casco com o solo é restrito à margem distal da parede e à ranilha. A ranilha é formada somente por queratina tubular, o que a torna mais macia e elástica. De formato triangular, cuja base fecha o espaço entre os talões, possui um sulco central e é separada das barras e da sola pelos sulcos paracuneais (DYCE, 2010).

A muralha do casco é formada por três camadas, o estrato externo, o estrato médio e o estrato interno. O estrato externo consiste em uma camada córnea

superficial que se estende distalmente ao perioplo (STASHAK, 2006). O estrato médio é composto por túbulos córneos e substância córnea intertubular, compreendendo a maior parte da parede do casco (POLLITT, 1990). O estrato médio confere rigidez e resistência mecânica ao casco (POLLITT, 2004a). O estrato interno é formado por lâminas epidérmicas primárias, e lâminas epidérmicas secundárias. As lâminas epidérmicas secundárias se entremeiam com as lâminas secundárias do tecido dérmico (POLLITT, 1990). O tecido dérmico é formado por uma matriz densa de tecido conjuntivo e contém artérias dispostas em forma de rede, veias, vasos capilares e nervos sensoriais (POLLITT, 2004a). A função principal deste tecido é conferir aderência entre as lâminas epidérmicas e o perióstio da falange distal (STASHAK, 2006).

No interior do casco estão localizadas a porção distal da falange média e a falange distal, além do osso sesamóide distal, que compõem a articulação interfalangiana distal (POLLITT, 1990). Esta articulação é estabilizada pelos ligamentos colaterais medial e lateral, ligamento sesamoideo distal ímpar e ligamentos sesamóideos colaterais medial e lateral, além da cápsula articular (KÖNIG & LIEBICH, 2002).

Na porção interna do casco, unidas à falange distal, encontram-se as cartilagens ungueais medial e lateral. Estas se dispõem como uma lâmina cartilágnea fibrosa estabilizada pelos ligamentos condroungulocompedais, condrocoronais medial e lateral, condroungularescolaterais medial e lateral, condrosesamoideos medial e lateral, condroungulares cruzados e o condropulvinar (KÖNIG & LIEBICH, 2002).

2.2. Suprimento sanguíneo do dígito equino

A vascularização do casco se dá por meio das artérias digitais lateral e medial (KÖNIG & LIEBICH, 2011). Tais artérias são oriundas da divisão da artéria digital comum. Na altura da falange proximal cada uma das artérias digitais origina um ramo circunflexo que ao se unir com a artéria do lado oposto forma um círculo arterial ao redor do osso (POLLITT, 1990).

No terço médio da falange média as artérias digitais novamente se ramificam originando artérias mais profundas que os tendões extensores e as cartilagens, que se conectam com as artérias do lado oposto formando ao redor da falange média e da borda coronária uma artéria circular, que nutre o tendão extensor digital e a articulação interfalangiana distal. Adjacente ao osso sesamoide distal as artérias digitais liberam ramos dorsais que suprem o cório lamelar dos talões e as anastomoses com o segmento palmar da artéria circunflexa da sola. Nesse osso também estão presentes em suas bordas proximais e distais os ramos medial e lateral da artéria digital que se ligam de forma direta através de anastomoses com outros ramos. Na altura do ligamento suspensor do osso sesamoide distal a artéria proximal se desloca e seus ramos se inserem na borda proximal do osso através do forame vascular (POLLITT, 1990).

A artéria digital em seu segmento terminal se insere no canal solear da falange distal e se une com a artéria do lado oposto formando um arco terminal intraósseo que irradia ramos através de forames da superfície dorsal da falange distal que irrigam a derme lamelar e também formam a artéria circunflexa que nutre o cório solear (POLLITT, 2004a).

A artéria circunflexa da sola é uma anastomose, formada por todos os ramos distais do arco terminal, e também pelas artérias dorsais da falange distal (POLLITT, 1990).

Na superfície dorsal do terço distal da falange distal, a disposição anatômica dos vasos se assemelha a do plexo pampiniforme dos testículos de mamíferos, em que uma artéria central é circundada por diversos capilares venosos, o que favorece a troca de calor entre estes, tornando a termorregulação do casco muito eficiente. Esta característica possibilita a sobrevivência dos equinos em ambientes bem

distintos e extremos como, por exemplo, o deserto ou a neve. As anastomoses arteriovenosas também auxiliam na termorregulação do casco (POLLITT, 2004a).

No casco existem três plexos venosos interligados, correspondentes ao, o plexo venoso dorsal situado na derme lamelar, o plexo venoso localizado no cório solear e na superfície interna axial das cartilagens da falange distal e o plexo coronário, situado no coxim coronário e próximo ao tendão extensor digital e a superfície externa abaxial da cartilagem da falange distal. Os três plexos são drenados pelas veias digitais lateral e medial (POLLITT, 1990).

A ausência de válvulas na maioria dos segmentos das veias do casco equino (MISHRA & LEACH, 1983), auxilia na drenagem do sangue de forma rápida no momento em que a rasilha e os tecidos moles do casco são comprimidos pela força mecânica gerada pelo contato do casco contra o solo, quando o animal se locomove (POLLITT, 1990). Porém, alguns segmentos das veias caudais e digitais do casco possuem válvulas que impedem o fluxo sanguíneo retrógrado para o casco, garantindo o retorno venoso para o coração (MISHRA & LEACH, 1983).

Diversas anastomoses arteriovenosas ligam as artérias e veias axiais por toda a derme lamelar, e estão presentes em maior número e tamanho próximo da origem das artérias axiais (POLLITT, 2004a).

A função normalmente realizada pelas anastomoses arteriovenosas está relacionada à termorregulação e modulação da pressão, como ocorre quando as anastomoses arteriovenosas se abrem e levam sangue arterial quente para a parede do casco, evitando o possível congelamento deste mediante temperaturas ambientais extremamente baixas (POLLITT, 2004a).

2.3. Crescimento da parede do casco

A muralha do casco dos equinos cresce durante toda sua vida, com o objetivo de repor o desgaste natural por contato com a superfície do solo (POLLITT, 2004a). A parede do casco cresce aproximadamente seis milímetros por mês, o que faz com que este se renove completamente no período de nove a doze meses. Esta taxa de crescimento pode ser influenciada por fatores como, ambientes frios e umidade baixa, que reduzem o crescimento do casco (STASHAK, 2006). A regeneração

contínua ocorre no estrato médio, formado por túbulos córneos que iniciam seu crescimento a partir do estrato germinativo da epiderme coronária. Nesses túbulos, as células das lâminas epidérmicas primárias vão se queratinizando de forma progressiva enquanto se movem no sentido distal (CÉLESTE & SZÖKE, 2005).

O crescimento também acontece de forma semelhante nas lâminas epidérmicas primárias da região proximal do casco (POLLITT, 2004a).

Os movimentos da região lamelar podem ocorrer através da proliferação das células ou por processos enzimáticos relacionados com a remodelação. A proliferação na região proximal é aproximadamente vinte vezes maior que o da porção distal, e a remodelação dentro da parede do casco após o final da fixação à falange distal, não necessita de proliferação das células epidérmicas (DARADKA & POLLITT, 2004).

A remodelação da epiderme e da matriz extracelular ocorre devido à ativação controlada de metaloproteinases, enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular formada por colágenos e proteoglicanos. As metaloproteinases tem sua ação regulada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). As metaloproteinases também agem sobre componentes moleculares dos desmossomos, auxiliando-os na separação dos hemidesmossomos (WOESSNER, 1991).

2.4. Histologia do casco

Estão presentes no casco relações geométricas especiais entre a epiderme e derme. O estrato externo é composto por material queratinizado mole, fino, branco e brilhante. E o cório perióplico altamente vascularizado e papilar, é composto por tecido conjuntivo típico, com a função de sustentar e nutrir a epiderme perióplica. A epiderme coronária ou estrato médio é composto por queratina típica, distribuída na forma de queratina tubular e intertubular. A epiderme lamelar é composta por queratina não tubular (BANKS, 1991).

Segundo STASHAK, (2006), existem aproximadamente 600 lâminas epidérmicas primárias, e em cada uma dessas lâminas existem entre 100 e 150 lâminas secundárias que se ramificam em ângulo de sua superfície. As lâminas

epidérmicas primárias estão organizadas verticalmente em fileiras paralelas com formato de retângulos longos e finos, já as extremidades das lâminas epidérmicas secundárias apresentam forma arredondada (POLLITT, 2004b).

As células epidérmicas basais compoem a primeira camada de células das LES, localizadas na face epidérmica da membrana basal, sofrem divisão continuamente, dando origem a células filhas, que maduras formam células queratinizadas não nucleadas compoem o eixo central da LES (POLLITT, 1995). Essas células basais possuem núcleo em formato oval localizado em seus ápices, posicionados distalmente a membrana basal (POLLITT, 2004b).

Entre as lâminas dérmicas e epidérmicas, se dispõe uma membrana de constituição lipoprotéica identificada como membrana basal (MB). A manutenção da estrutura laminar depende da integridade da MB. Ela possui estrutura disposta tridimensionalmente, formada por filamentos de colágeno tipo IV que se entrelaçam com glicoproteínas, em especial a laminina tipo 1, e formam a lâmina densa. No caso de perda da integridade e funcionalidade da membrana basal, a epiderme ligada a esta membrana perde sua configuração normal, evidenciada na lãminite aguda. À observação da MB à microscopia eletrônica de transmissão, constata-se o domínio da lâmina densa, que aparece como uma linha escura contornando as células epidérmicas basais. Nas células basais se visualizam inúmeras placas de adesão denominadas hemidesmosomos. Esses agregados protéicos formam ligação entre o interior da célula com o exterior composto por tecido conjuntivo. As proteínas que completam a lacuna entre os hemidesmosomos e a lâmina densa são conhecidas como lamininas do tipo cinco (POLLITT, 2004a).

2.5. Biópsia do casco

As dificuldades encontradas em acessar o tecido dérmico e epidérmico podal tem sido a grande barreira de protocolos experimentais que buscam avaliar o desenvolvimento de afecções que acometem o casco equino (GRAVENA et al., 2012).

CROSER & POLLITT (2006) realizaram biópsias de tecido laminar antes e durante a fase prodrômica da laminite induzida pela administração de oligofrutose, confirmando as alterações no tecido laminar e correlacionando o tempo de duração dos sinais clínicos com a gravidade das alterações encontradas.

MORGAN et al. (2003) realizaram trabalho semelhante com equinos que receberam sobrecarga de carboidratos, concluindo que a separação da MB é um passo tardio na patogênese da laminite aguda, e que a hipoperfusão vascular é um fator agravante para o desenvolvimento de alterações.

Em estudo desenvolvido por HANDLY et al. (2009), que realizaram oito biópsias no mesmo casco do membro torácico em equinos adultos saudáveis, demonstrou-se que a colheita seriada de amostras de tecido laminar permite boa avaliação destes tecidos, com mínimo desenvolvimento de claudicação e desconforto aos animais.

GRAVENA et al. (2012) realizaram estudo com o objetivo de avaliar a integridade dos tecidos dérmicos e epidérmicos colhidos pelo acesso transmural dorsal do casco de equinos. Nesse estudo, não foram observadas alterações nos parâmetros clínicos e os equinos não desenvolveram claudicação. Os exames radiográficos demonstraram a integridade da superfície da falange distal e bom alinhamento desta com a parede do casco. E quanto à amostra, demonstrou-se que as lâminas epidérmicas e dérmicas primárias foram preservadas permitindo boa análise microscópica óptica e eletrônica. A membrana basal se manteve intacta com claro delineamento e sem interrupções, concluindo que o método utilizado para colheita de tecido laminar possibilita a colheita em série desse material para análises histológicas, sem que se perca a integridade dos tecidos colhidos.

2.6.Síndrome cólica e laminite equina

A cólica é a principal responsável por morte em equinos, sendo superada apenas pelas claudicações quanto a perdas econômicas. Este distúrbio está relacionado em geral a alterações morfofuncionais dos diferentes segmentos do trato gastrointestinal (PEIRÓ & MENDES, 2004).

Em sua definição mais estrita, o termo “cólica” significa dor no cólon. Porém com o passar do tempo, o termo se tornou mais abrangente para afecções de etiologias e gravidade amplamente variáveis que levam os equinos a quadros de dor abdominal (MOORE, 2001a).

A manifestação da dor na cólica pode ser aguda, crônica ou recorrente, tendo como causas comuns à distensão intestinal com fluídos, gases ou ingesta, tração da raiz mesentérica, vólvulos, úlceras no estômago ou intestino e peritonite (SMITH, 2006).

Em estudo retrospectivo desenvolvido por CORRÊA et al. (2006), realizado em condições tropicais, destacou-se que as afecções que envolvem o intestino grosso representavam 19% das ocorrências, dos quais mais da metade (51,35%) foram ocasionadas por obstrução do cólon menor.

Sabe-se que a distensão intraluminal do cólon menor de equinos promove isquemia mediante a redução da perfusão microvascular na parede intestinal (FALEIROS et al., 2002). E, mesmo que esta distensão não seja suficiente para causar danos à mucosa, pode ser suficiente para causar lesões na camada seromuscular e lesões remotas nos pulmões, ambas características da isquemia e reperfusão (FALEIROS et al., 2008). As lesões típicas de isquemia e reperfusão também foram associadas a diferentes complicações pós-cirúrgicas, dentre as quais se destacam a endotoxemia e a laminite (MOORE et al., 1995).

Os equinos são particularmente sensíveis aos efeitos de endotoxinas (lipopolissacarídeos, LPS) (BEHRE et al., 1992; KING & GERRING, 1988; URIU et al., 2002). Os LPS estão presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas que compõem em associação com organismos gram-positivos e protozoários, a microbiota do trato intestinal dos equinos, de modo que estes LPS são liberados quando ocorre replicação rápida, lise ou morte bacteriana, podendo então atingir a corrente circulatória gerando quadro de endotoxemia (KUESIS & SPIER, 2000; MOORE, 2001b).

A mucosa intestinal intacta é a primeira linha de defesa frente às endotoxinas; desta forma, quando há comprometimento da mucosa intestinal ocorre ativação de células fagocitárias, linfócitos e fator de necrose tumoral (TNF), juntamente com

imunoglobulinas, complementos e reagentes da fase aguda, que compõem os mecanismos secundários de defesa (KUESIS & SPIER, 2000).

A laminite equina é conhecida como a inflamação das lâminas do casco, caracterizada pela degeneração, necrose e inflamação das lâminas dérmicas e epidérmicas da parede do casco de equinos (SMITH, 2006).

A laminite é um distúrbio extremamente doloroso e debilitante no qual existe a separação das lâminas dérmicas e epidérmicas responsáveis pela coesão entre a falange distal e a muralha do casco, sendo afecção grave que, com certa frequência, se manifesta no decorrer ou após quadros de abdômen agudo. A ligação entre endotoxemia e laminite foi postulada, embora os LPS não causem a laminite diretamente (HOOD, 1995).

Como as lâminas epidérmicas sustentam a falange distal, e conseqüentemente o peso do animal, a degeneração ocasionada na laminite destrói o mecanismo de sustentação do peso, permitindo que as forças desloquem a falange distal ventralmente (SMITH, 2006). Essa afecção pode ser classificada em aguda, sub-aguda ou crônica, podendo acometer os quatro membros do animal. Dentre os achados clínicos mais comuns nos casos agudos estão a anorexia, decúbito lateral, relutância em caminhar, elevação da temperatura no casco, especialmente próximo a coroa, aumento do pulso das artérias digitais, aumento da frequência cardíaca e respiratória em consequência da dor, além de outros sinais característicos. Nos casos crônicos de laminite podem ocorrer alterações na forma do casco, como o aparecimento de linhas irregulares de crescimento no tecido córneo, os chamados anéis laminíticos e sola convexa, além de alguns dos sinais também presentes na laminite aguda. A rotação da falange distal constitui seqüela, que pode progredir até a perfuração da sola (JEFFCOTT, 2001).

Os fatores predisponentes à laminite são múltiplos e variados, incluindo superalimentação, trauma, infecções sistêmicas, administração de glicocorticoides, sustentação excessiva do peso no membro de apoio devido à claudicação severa no membro contralateral, trabalho pesado em piso duro e irregular, exaustão e desidratação extrema (MOORE et al., 1989), após casos de torção de cólon, enterite, pleuropneumonia, metrite séptica, ingestão excessiva de água fria após exercício intenso, além de diversos outros fatores (SMITH, 2006).

2.7. Metaloproteinasas 2 e 9

As metaloproteinasas (MMPs) constituem uma família de mais de 20 endopeptidases cálcio e zinco dependentes, relacionadas com a degradação da matriz extracelular. As MMPs são classificadas como colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs tipo membrana e outras MMPs. O grupo das gelatinases é composto pela gelatinase-A (MMP-2) e pela gelatinase-B (MMP-9) (RAFFETTO & KHALIL, 2008).

A MMP-2 e a MMP-9 são importantes na migração de células provenientes do sangue para os tecidos, devido à sua propriedade de digerir o colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, rompendo desta forma a integridade estrutural da parede dos vasos sanguíneos, permitindo que as células inflamatórias migrem para o espaço extracelular (SELLNER & LEIB, 2006).

A matriz extracelular do tecido conjuntivo, em condições fisiológicas normais, se remodela constantemente de modo a permitir o crescimento e a regeneração. Essas remodelações tem a participação das MMPs, cuja ação proteolítica é controlada especialmente pelos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) (VU & WERB, 2000).

Os TIMPs evitam a degradação excessiva da matriz extracelular. O desequilíbrio entre as MMPs e seus TIMPs podem gerar grande aumento na atividade das MMPs, levando a lesões na estrutura celular (RAFFETTO & KHALIL, 2008). Assim, as MMPs estão envolvidas na patogenia de inúmeras enfermidades dos mamíferos, incluindo os equinos (CLUTTERBUCK et al., 2010).

As MMPs são secretadas como pró-enzimas por neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e por células tumorais em resposta a estímulos de natureza variada (WOESSNER, 1991). Estas pró-enzimas (pró-MMPs) são inativas e necessitam passar por clivagem proteolítica para sua ativação (VISSE & NAGASE, 2003). A clivagem proteolítica faz parte de uma cascata enzimática que envolve proteases plasminogênicas, agentes não proteolíticos e até mesmo outras MMPs (NAGASE & WOESSNER, 1999).

A expressão das MMPs pode ser regulada por citocinas pró-inflamatórias em diversos tipos de tecidos, o que indica relação entre a inflamação e as MMPs

(CLUTTERBUCK et al., 2010). Sabe-se que a presença e atividade das MMPs fazem parte da patogenia da cólica e da laminite em equinos (AROSALO et al., 2007; POLLIT et al., 1998). Quatro fatores podem desencadear a ativação de MMPs em equinos com laminite, sendo a liberação de aminas pela descarboxilação bacteriana dos aminoácidos, a liberação de endotoxinas oriundas da lise de bactérias, a liberação de exotoxinas por bactérias gram-positivas e fatores relacionados à obesidade (BAILEY et al., 2004).

A degradação laminar podal causada pelas MMPs tem sido associada à resposta inflamatória devido à liberação de fatores de ativação de MMPs da corrente sanguínea para os dígitos, contribuindo para o processo degenerativo (CLUTTERBUCK et al., 2010). BELKNAP et al. (2007), demonstraram aumento significativo na expressão lamelar de IL-1b, IL-6 e IL-8 em fases de desenvolvimento da laminite, tal fato, pode estar relacionado com a regulação e expressão de MMPs no tecido lamelar (CLUTTERBUCK et al., 2010).

Sabe-se que algumas formas de laminite podem ter ligações com a liberação de toxinas do intestino para a corrente sanguínea, como por exemplo, quando lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias Gram-negativas mortas levam à liberação de mediadores inflamatórios (MENZIES-GOW et al., 2004), podendo estimular a ativação de MMPs no dígito equino (CLUTTERBUCK et al., 2010).

POLLITT et al. (1998) avaliaram o desprendimento das lâminas dérmicas e epidérmicas podais na presença de um ativador de MMPs. Na avaliação histológica, observou-se a separação entre as células basais da epiderme e a membrana basal, semelhante ao que ocorre em casos de laminite. Já nas análises zimográficas, as amostras cultivadas sem a presença de APMA continham apenas a pro-MMP-9. Porém, as amostras cultivadas com o ativador de MMP, revelaram aumento na presença de MMP-2 e MMP-9 ativas. Testaram ainda a eficácia do inibidor de MMPs conhecido como batimastat (BB-94). Este foi adicionado ao meio de cultura das amostras cultivadas na presença do ativador de MMPs, e como resultado impediu a separação das lâminas, através da inibição parcial da atividade enzimática. A ativação das MMPs pode ser responsável pelo desprendimento lamelar em casos de laminite, e o uso de inibidores de MMPs pode ser útil clinicamente para a prevenção desse processo (POLLITT et al., 1998).

MEDINA-TORRES et al. (2011), desenvolveram estudo com a intenção de avaliar a possível relação entre a isquemia nos tecidos laminares e a possível produção e/ou ativação de MMP-2 e MMP-9. Esta hipótese foi testada *in-vitro*, utilizando-se cultura de células (queratinócitos). Os resultados assinalaram que os queratinócitos não estimulados (em condições de normóxia) expressaram as MMPs 2 e 9. Nas culturas que sofreram hipóxia por 24 horas as concentrações das formas inativas foram reduzidas, enquanto as formas ativas das MMPs 2 e 9, aumentaram. Algumas culturas que sofreram período de hipóxia adicional de até 16 horas apresentaram aumento gradual nas concentrações de MMP 2 e 9 ativas, obtendo aumentos dos valores da ordem de até 127% e 163% para a MMP-2 inativa e ativa, respectivamente, e de 433% da MMP-9 ativa quando comparadas às culturas de células controle.

Esses resultados destacaram a hipóxia como potencial regulador e ativador de formas inativas e ativas de MMPs no casco equino, levando a crer que distúrbios hemodinâmicos que resultam em isquemia regional dão início à regulação e ativação das MMPs nas lâminas do casco equino, podendo resultar em danos à membrana basal e separação lamelar posterior, além de contribuir para a migração de neutrófilos inflamatórios para o casco. Considera-se ainda que as MMPs 2 e 9 como potenciais biomarcadores dos estágios prodrômicos da laminite, contribuindo para o rápido diagnóstico e acompanhamento dos casos clínicos de laminite (MEDINA-TORRES et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

O presente trabalho objetivou avaliar a expressão das MMPs, assim como a ocorrência de lesões, nos tecidos dérmico e epidérmico lamelar do dígito em equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor.

3.2. Específicos

Analisar qualitativa e quantitativamente, através de técnica zimográfica, a presença das MMP-2 e MMP-9 ativas e suas formas inativas (pró-MMP-2 e pró-MMP-9) no tecido laminar do casco de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor.

Analisar a integridade celular no tecido dérmico e epidérmico do casco por meio de microscopia óptica com coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), em equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor.

Analisar a integridade da membrana basal do tecido dérmico e epidérmico do casco por meio de microscopia óptica com coloração de ácido periódico de Schiff (PAS), em equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados oito equinos adultos, três machos e cinco fêmeas, sem raça definida, entre oito e quatorze anos de idade. Previamente ao início do período experimental, os animais foram examinados clinicamente para determinação da higidez. Foram utilizados equinos hígdos e em bom estado nutricional, que passaram por programa de desverminação¹ e controle de ectoparasitas².

Os animais foram alocados em baias individuais, nas dependências do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP e receberam como alimentação diária 1% do peso corpóreo em alimento volumoso, constituído de feno de Tifton; 1% do peso corpóreo em ração comercial; sal mineral e água *ad libitum*. Os equinos constituíram um único grupo e amostras de tecido laminar do casco foram colhidas em três momentos (T), à saber:

- T0: Imediatamente antes da obstrução intraluminal do cólon menor.
- T4: Imediatamente após a desobstrução do cólon menor.
- T72: Após 72 horas da desobstrução do cólon menor.

4.2. Biópsia de Casco

As amostras de tecido laminar do casco foram colhidas por meio da técnica descrita por GRAVENA et al. (2012). O local das biópsias foi determinado a 2,0 cm do bordo distal da banda coronária. O acesso à região laminar foi realizado por meio de uma abertura de aproximadamente 20 mm de diâmetro (figura 1-A), feita com o

¹Equalan[®]. Merial Saúde Animal LTDA. São Paulo, SP.

²Butox[®] P CE 25. Intervet Brasil- Akzo Nobel Ltda. São Paulo, SP.

auxílio de uma broca chata com ponta montada de Óxido de Alumínio de 9,5 mm³ acoplada a uma micro retífica⁴ que promoveu o desgaste da porção córnea na parte externa da parede do casco até o limite do córium laminar, determinado com o auxílio de uma pinça utilizada para pressionar a porção córnea do tecido laminar. Após a abertura do acesso e antissepsia, utilizou-se uma lâmina de bisturi de número 11 estéril⁵ para incisar a amostra (figura 1-B) de aproximadamente 10x10mm até a profundidade da superfície dorsal da falange distal (figura 1-C). Um esculpador Frahn simples⁶ estéril foi utilizado para desprender o fragmento da superfície da falange distal (figura 1-D e 1-E). Após a retirada das amostras (figura 1-F), em T0 e T4 o local da biópsia foi limpo e recoberto por gaze estéril e atadura de crepom, provisoriamente. Após a colheita da amostra em T72, a parede do casco foi definitivamente recoberta com duas camadas de resina de metilmetacrilato⁷, sendo uma delas associada ao metronidazol⁸ como descrito por GRAVENA et al. (2012).

Em cada momento de colheita foram obtidas duas amostras, sendo a primeira utilizada para avaliação histológica, fixada em solução de formaldeído tamponado a 10%⁹ para posterior inclusão em parafina e, a segunda, utilizada para avaliação zimográfica. A última passou por congelamento rápido e armazenamento em nitrogênio líquido, sendo posteriormente mantido a -70°C até o momento do processamento da amostra para análise.

³Ponta montada de óxido de alumínio 9,5mm DREMEL 932[®]. Robert Bosch América Latina. Campinas, SP.

⁴DREMEL 300[®]. Robert Bosch América Latina. Campinas, SP.

⁵Lâmina de bisturi descartável n°11 EMBRAMAC[®]. Wuxi Xinda Medical Device Co. LTD. Wuxi City, China.

⁶Esculpador Frahn simples n°6. Erwin Guth, São Caetano do Sul, SP.

⁷Resina Clássico pó[®]. Artigos odontológicos Clássico. São Paulo, SP.

⁸Metronidazol 250 mg. Neo Química. Anápolis, GO.

⁹Formol tamponado 10%. Indalabor Indaiá Laboratório Farmacêutico LTDA. Dores do Indaiá, MG.

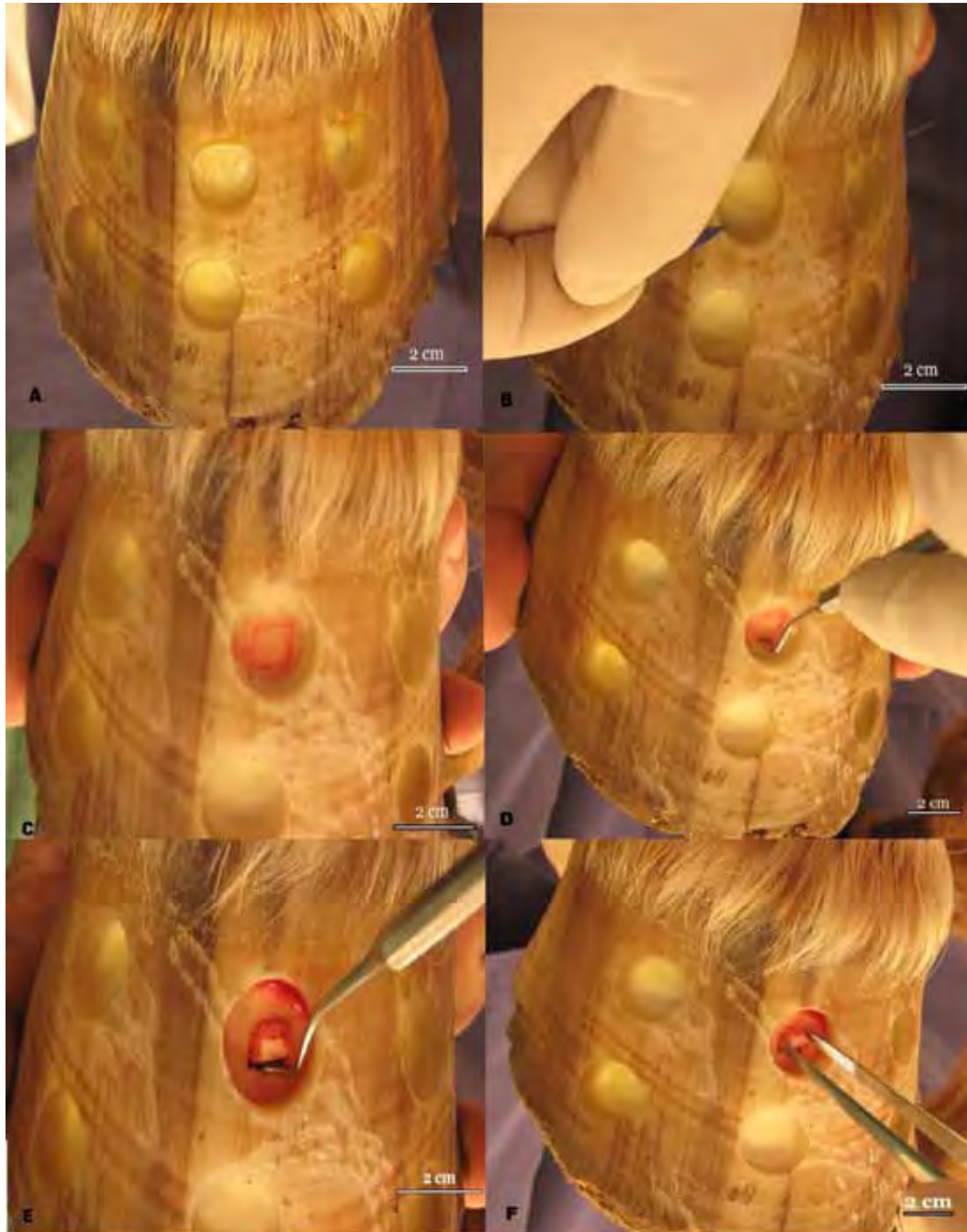


Figura 1. Imagem fotográfica da sequência de procedimentos para colheita de amostra de tecido laminar do casco equino.

(A) orifício na parede do casco de aproximadamente 20 mm de diâmetro, com antissepsia realizada. (B) abordagem para incisão do tecido laminar. (C) superfície do cório demonstrando a incisão do tecido laminar de aproximadamente 10X10 milímetros. (D) introdução do esculpador Frahn em uma das bordas da amostra para separação do tecido laminar da superfície dorsal da falange distal. (E) amostra separada da superfície da falange. (F) retirada da amostra de tecido laminar com auxílio de uma pinça anatômica. Jaboticabal, 2013.

4.3. Celiotomia mediana transumbilical e obstrução intraluminal do cólon menor em equinos

Após jejum alimentar e hídrico de 24 e 12 horas, respectivamente, os equinos receberam preparo pré-cirúrgico. Este envolveu tricotomia e higienização da região abdominal ventral do animal, delimitado craniocaudalmente pelo xifóide e região do púbis, e dorsoventralmente pela região paramediana ventral direita e esquerda. Implantou-se um cateter¹⁰ na veia jugular esquerda para administração de fluídos e fármacos durante o período experimental.

A medicação pré-anestésica incluiu sedação dos animais com cloridrato de detomidina¹¹ na dose de 0,015 mg/kg, por via intravenosa (IV) e, passados 10 minutos, administrou-se midazolam¹² na dose de 0,1 mg/kg IV. A indução anestésica foi realizada pela administração IV de cloridrato de cetamina¹³ na dose de 2 mg/kg, levando o animal ao decúbito. Quando em decúbito lateral, realizou-se intubação com sonda orotraqueal. Os animais foram mantidos sob anestesia geral inalatória com isoflurano¹⁴ vaporizado em oxigênio, em circuito semi-fechado, com respiração controlada mecanicamente.

Administrou-se diariamente 5% do peso corpóreo do animal em solução de Ringer para a manutenção da volemia. Para manutenção da pressão arterial média (PAM), monitorada por meio de cateter¹⁵ posicionado no ramo mandibular da artéria facial, foram administrados 0,002 mg/kg/min de dobutamina¹⁶ IV.

A intervenção cirúrgica foi realizada com os equinos em decúbito dorsal, após antisepsia do campo cirúrgico com polivinilpirrolidona-iodo tópico a 1%. Como via de acesso a cavidade abdominal, foi utilizada a celiotomia mediana transumbilical, realizada após estabilização da anestesia. O cólon foi visibilizado, exteriorizado, isolado do campo operatório por compressas cirúrgicas estéreis e, após a identificação das porções oral e aboral, o conteúdo intestinal foi ordenhado

¹⁰ BD Insyte® Autoguard® 20G. BD-Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas S.A. Juiz de Fora, MG.

¹¹ Dormiun V®. Agener União Saúde Animal. Pouso Alegre, MG.

¹² Dormire®. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. Itapira, SP.

¹³ Ketamina Agener 10%®. Agener União Saúde Animal. Pouso Alegre, MG.

¹⁴ Isoforine®. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. Itapira, SP.

¹⁵ BD Insyte® Autoguard® 24G. BD-Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas S.A. Juiz de Fora, MG.

¹⁶ Dobutariston®. Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas LTDA. São Paulo, SP.

manualmente em sentido aboral, de forma a esvaziar o segmento a ser obstruído. A partir do limite oral deste segmento, realizou-se enterotomia através da qual se inseriu um balão de vinil¹⁷ no lúmen intestinal. O balão foi inflado até atingir pressão positiva de 80 mmHg, promovendo compressão da parede intestinal. A pressão interna do balão foi mensurada por meio de um esfigmomanômetro acoplado ao sistema de injeção de ar. Já com o balão inflado, realizou-se enterorrafia e o cólon foi reposicionado na cavidade abdominal.

Durante o procedimento cirúrgico, o cólon menor, quando exposto, foi umedecido com solução de cloreto de sódio 0,9%¹⁸. Decorridas quatro horas do início da obstrução, o cólon menor foi novamente exposto e o balão de vinil esvaziado e retirado do animal, realizando-se a enterorrafia do segmento. Ambas as enterorrafias foram realizadas com fio de poliglactina 910 número 2-0¹⁹ em dois planos, sendo o primeiro em padrão Schimieden e o segundo plano em padrão Cushing. Após a realização das enterorrafias, o cólon menor foi reposicionado à cavidade abdominal e a linha alba foi suturada em padrão Sultan com fio de nylon²⁰. O tecido subcutâneo foi reduzido por sutura em padrão Cushing com fio de poliglactina 910 número 0²¹. A dermorrafia foi realizada em padrão Wolff utilizando-se fio de nylon²⁰.

¹⁷ Nabaiji Water Polo 6". Wujiang City Huangjun Textile Co., Ltd. Jiangsu, China.

¹⁸ Fisiológico cloreto de sódio a 0,9%. JP Indústria Farmacêutica S.A. Ribeirão Preto, SP.

¹⁹ Vicryl® 2-0. Ethicon. São José dos Campos, SP.

²⁰ Fio de Nylon 3 agulhado. Shalon Suturas. São Luís de Montes Belo, GO.

²¹ Vicryl® 0. Ethicon. São José dos Campos, SP.

4.4. Cuidados pós-cirúrgicos

No período pós-cirúrgico, os animais receberam ceftiofur²² na dose de 2,2 mg/kg, a cada 12 horas, IV, cloridrato de tramadol²³ na dose de 1,1 mg/kg, a cada seis horas, sendo administrados 0,55 mg/kg por via intramuscular (IM) e 0,55 mg/kg IV e butilbrometo de escopolamina²⁴ na dose de 0,25 mg/kg a cada seis horas IV. As terapias antibiótica e analgésica foram iniciadas no ato cirúrgico após o fechamento da cavidade abdominal e perduraram até o término das avaliações. Realizou-se curativos da ferida cirúrgica a cada 12 horas mediante limpeza com polivinilpirrolidona-iodo tópico a 1% durante dez dias após o procedimento cirúrgico, quando então os pontos de pele foram retirados.

No decorrer do período pós-cirúrgico os animais receberam como alimentação capim fresco e água à vontade.

4.5. Análise histológica

Após a colheita por biópsia, as amostras de tecido laminar dos cascos foram fixadas durante 24 horas em formalina tamponada a 10%. Sequencialmente o tecido foi desidratado em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 60 minutos cada, imersas três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol²⁵. A impregnação e inclusão em parafina²⁶ foram efetuadas em duas incubações durante uma hora a 60°C. As amostras foram clivadas e incluídas transversalmente com as porções centrais do fragmento de tecido posicionadas mais externamente no bloco. As amostras de tecido laminar dos cascos foram então cortadas em fragmentos de 5 µm de espessura no micrótomo Spencer 820²⁷. Os cortes foram posicionados sobre lâminas de vidro desengorduradas e previamente

²²Minoxel[®] 8G. Lapisa. La Piedad, México.

²³Tramal[®]. Laboratórios Pfizer LTDA. Guarulhos, SP.

²⁴Buscopan[®]. Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica LTDA. Itapeceira da Serra, SP.

²⁵Reagen produtos para Laboratório S.A., Colombo, PR.

²⁶Paraplast[®]. Sigma-Aldrich. St. Louis, EUA.

²⁷American Optical. EUA.

enfilmadas com solução de glicerol-albumina (0,5%) e mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas.

Os cortes de tecido laminar foram corados com HE para a visibilização de lesões celulares e com ácido periódico de Schiff (PAS) para visibilização de lesões na membrana basal deste tecido.

As imagens obtidas por microscopia óptica foram sistematicamente fotomicrografadas²⁸ e avaliadas quanto à presença de alterações por um sistema de análise de imagem computadorizada²⁹.

4.6. Análise zimográfica das metaloproteinases 2 e 9

As análises zimográficas foram realizadas no laboratório de Patologia Aplicada do departamento de clínica, cirurgia e reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, sob orientação da Prof^a. Dra. Gisele Fabrino Machado.

A extração das proteínas das amostras de tecido laminar do casco foi realizada macerando-se um fragmento de cada amostra de aproximadamente 0,2 gramas (g) em 1,0 mL de tampão de lise (Tris 50mM (6,057 g), NaCl 150 mM (8,775 g), CaCl₂ 5 mM (0,555 g), éter dodecil-polioxietilenoglicol 0,05% (Brij-35) (0,5 g), água destilada (qsp) (1000 mL) e tablete inibidor de protease³⁰ 1/50 ml) com auxílio de gral de porcelana e pistilo. O conteúdo macerado foi colocado em microtubos e centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm, a 4°C. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante que foi transferido para outro microtubo para quantificação proteica. Todo o procedimento para extração das proteínas das amostras foi realizado a 4°C sobre uma cuba de gelo em sala climatizada.

Após a extração foi realizada a quantificação das proteínas pelo método do ácido bicinconínico³¹. Este teste foi realizado utilizando-se uma placa para microtitulação tipo ELISA, em duplicatas o número de amostras a serem analisadas. Foi determinada a utilização de cinco pontos da curva padrão (200 µL/mL, 400

²⁸ Camedia Olympus 95-98 ME, Olympus.

²⁹ Image Pro[®] Plus. Cybernetica, Rockville, EUA.

³⁰ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets. Roche Applied Science, Alemanha.

³¹ Pierce BCA Protein Assay Reagent. Pierce Biotechnology, EUA.

$\mu\text{L/mL}$, 600 $\mu\text{L/mL}$, 800 $\mu\text{L/mL}$ e 1000 $\mu\text{L/mL}$ de BSA). Em cada um dos respectivos poços foram colocados 10 μL de cada uma das cinco concentrações dos pontos da curva padrão. Então, adicionou-se 10 μL da amostra a ser analisada e 200 μL de solução de trabalho a cada um dos poços em duplicata. A solução de trabalho foi composta por cinquenta partes do reagente A para uma parte do reagente B do Kit BCA 23225⁴. A placa foi então incubada em estufa a 37°C por 30 minutos e posteriormente analisada em espectrofotômetro com absorvância de 562 nm (540-590 nm). A concentração de proteínas foi estimada (em $\mu\text{L/mL}$) por meio de equação de regressão. Após o estabelecimento da concentração de proteínas de cada amostra, o volume foi ajustado para que houvesse 15 μg de proteínas por amostra, quando necessário diluindo a amostra com água destilada, para que fosse mantido o volume de 10 μL .

A eletroforese não desnaturante foi realizada utilizando-se uma cuba de eletroforeses vertical³². Após a montagem das placas de vidro, as mesmas foram lavadas com álcool e secadas com papel filtro. Então procedeu-se a confecção do gel de corrida a 10% (4 mL de gelatina tipo A (1mg/mL), 3,3 mL de Acrilamida/Bis (30:0,8), 2,5 mL de Tris-HCl pH 8,8 1M, 100 μL SDS 1%, 100 μL PSA 10% e 4 μL de TEMED). O gel de corrida foi adicionado entre as placas de vidro da cuba, deixando-se aproximadamente 1 cm entre a superfície do gel e a borda do vidro, para que posteriormente fosse adicionado o gel de empilhamento. Foram colocados aproximadamente 1000 μL de etanol absoluto sobre o gel de corrida para que houvesse a polimerização deste sem irregularidades. Após a polimerização do gel de corrida (aproximadamente 15 minutos) o etanol absoluto foi retirado e o local foi seco cuidadosamente com papel filtro (sem que o gel fosse tocado). Então o gel de empilhamento a 5% (2,1 mL de água destilada, 500 μL de Acrilamida/Bis (30:0,8), 380 μL de Tris-HCl pH 6,8 1M, 30 μL de SDS 0,5%, 30 μL de PSA 10% e 3 μL de TEMED) foi adicionado sobre o gel de corrida. O pente para formação dos poços, também foi colocado. Após a polimerização do gel de empilhamento (aproximadamente 15 minutos), o pente foi retirado, e os poços então formados foram lavados com água destilada. Logo após os géis foram colocados dentro da cuba de eletroforese e esta foi preenchida com tampão de corrida, pH 8,3, gelado,

³²MiniVeAmershamVertical Electrophoresis System®.GE Healthcare Life Sciences, Inglaterra.

de forma que a plataforma com os géis ficasse submersa. O tampão de corrida foi constituído de 30,2 g de Tris base 250 mM, 144 g de Glicina 1,92 M, 10 g de SDS 1% e 1000 mL de água destilada.

Com os géis prontos, as amostras com volume de 10 μ L (amostra/água destilada), contendo 15 μ g de proteínas, tiveram 10 μ L de tampão de amostra (2 mL de Glicerol, 0,4 g de SDS 4%, 0,05 g azul de bromofenol e 10 mL de Tris-HCl 0,125 M pH 6,8) adicionado.

Este conteúdo (amostra/tampão de amostra) foi colocado em cada poço do gel de empilhamento (um poço por amostra), a partir do segundo poço, pois no primeiro poço foi adicionada a amostra controle (amostra controle/colagenase, MMP recombinante, neoplasia). A cuba foi fechada e colocada dentro de um recipiente com gelo e a corrida foi iniciada. O gel de empilhamento foi corrido a 110V e 50 mA (25 mA por gel), quando as amostras ultrapassaram o limite entre o gel de empilhamento e o gel de corrida, estes valores foram alterados para 125V e 80 mA (40 mA por gel) e a corrida durou aproximadamente três horas.

Após o término da corrida dos géis, deu-se início aos procedimentos de detecção enzimática. Para isso os géis foram lavados em solução de Triton X-100 2,5% durante 30 minutos em temperatura ambiente sob constante agitação. Posteriormente, os géis foram incubados em tampão de ativação enzimática (6,057 g de Tris 50 mM, 1,11 g de CaCl_2 10 mM, 0,65 g de NaN_3 (azida sódica) 10 mM, 2,0 mL de Brij-35 0,2%, 1000 mL de água destilada (qsp) pH 7,6) por vinte horas a 37°C (em estufa) sob constante agitação.

Após serem incubados, os géis foram corados com azul de Coomassie 0,5% (1 g de Azul de Coomassie R-250 0,5% e 200 mL de solução fixadora, composta por 500 mL de álcool metílico, 100 mL de ácido acético glacial e 400 mL de água destilada) durante 30 minutos. Após este procedimento os géis foram descorados em solução descorante (500 mL de álcool metílico, 100 mL de ácido acético glacial e 400 mL de água destilada), durante aproximadamente 40 minutos. Então os géis foram armazenados em água destilada a 4°C durante um dia, para melhorar seu contraste.

Os géis foram fotografados com alta resolução, utilizando-se foto documentador, que forma imagens de tamanho e qualidade padronizada. Estas

imagens dos géis foram posteriormente analisadas utilizando-se o software Image J³³, com o método da densidade integrada (expresso em unidades arbitrárias).

4.7. Análise estatística

As variáveis foram analisadas segundo delineamento em blocos casualizados do programa computacional AgroEstat (2011)³⁴. Realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) para avaliar a quantidade de MMPs (pró-MMP-2, MMP-2-ativa e pró-MMP-9) detectadas durante os três momentos experimentais. Utilizou-se o teste Tukey para a comparação das médias das MMPs em cada um dos momentos experimentais. Para todas as análises realizadas estabeleceu-se o nível de significância igual a $p < 0,05$.

³³ Image processing and analysis in Java. National Institutes of Health, EUA.

³⁴ AgroStat- Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos, Versão 1.1.0.626, 2011.

5. RESULTADOS

5.1. Análises histológicas

As análises histológicas das amostras colhidas em T0 coradas com HE não evidenciaram alterações em sua morfologia normal (figuras 2 e 3)

No momento T4 foram encontradas alterações nas amostras de dois animais. Nestes, observou-se células em apoptose e perda do posicionamento anatômico normal das lâminas dérmicas e epidérmicas.

As amostras colhidas em T72 apresentaram alterações em sua morfologia normal. Observou-se número elevado de células em apoptose (figura 4), intensa proliferação de queratinócitos entre a membrana basal e a porção queratinizada das lâminas, alongamento das lâminas epidérmicas secundárias (figura 5), aumento no número de vasos na derme, núcleos picnóticos e posicionamento anatômico anormal das lâminas dérmicas secundárias e lâminas epidérmicas secundárias (figura 4).

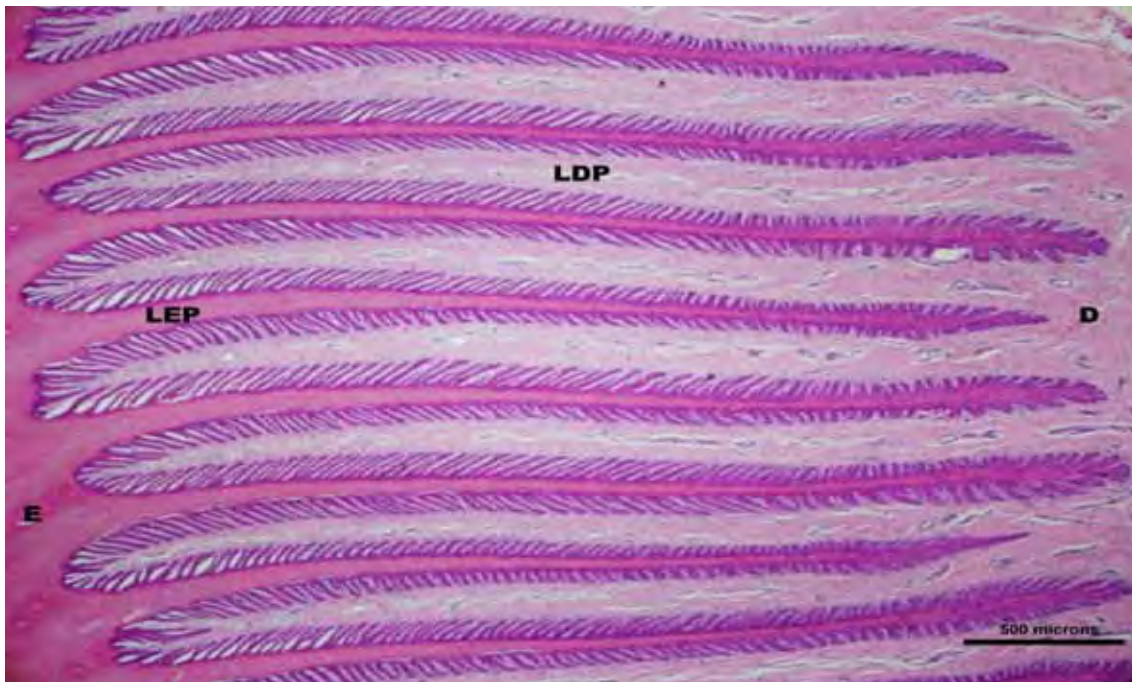


Figura 2. Fotomicrografia ilustrando a derme (D), epiderme (E), lâminas epidérmicas primárias (LEP) e lâminas dérmicas primárias (LDP) do tecido laminar de equino obtido por meio de biópsia no momento T0. Observa-se a integridade das estruturas. Hematoxilina-Eosina, obj 4x. Jaboticabal 2013.

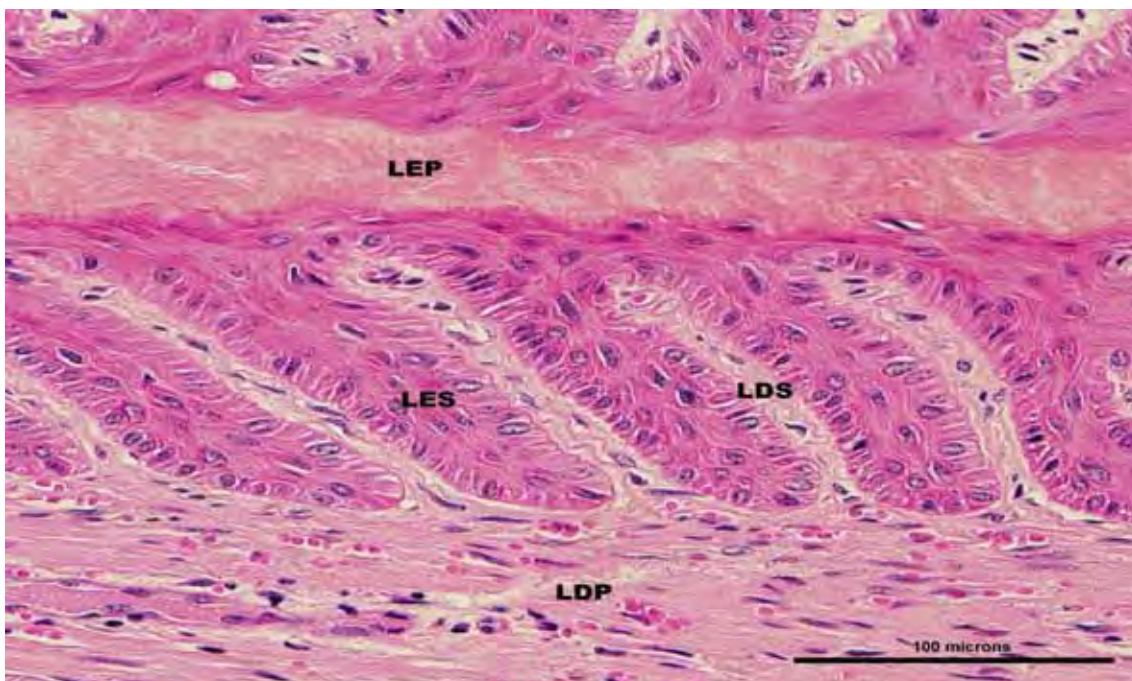


Figura 3. Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas primárias (LEP), lâminas dérmicas primárias (LDP), lâminas epidérmicas secundárias (LES) e lâminas dérmicas secundárias (LDS) do tecido laminar de equino obtido por meio de biópsia no momento T0. Observa-se a integridade das estruturas. Hematoxilina-Eosina, obj 40x. Jaboticabal 2013.

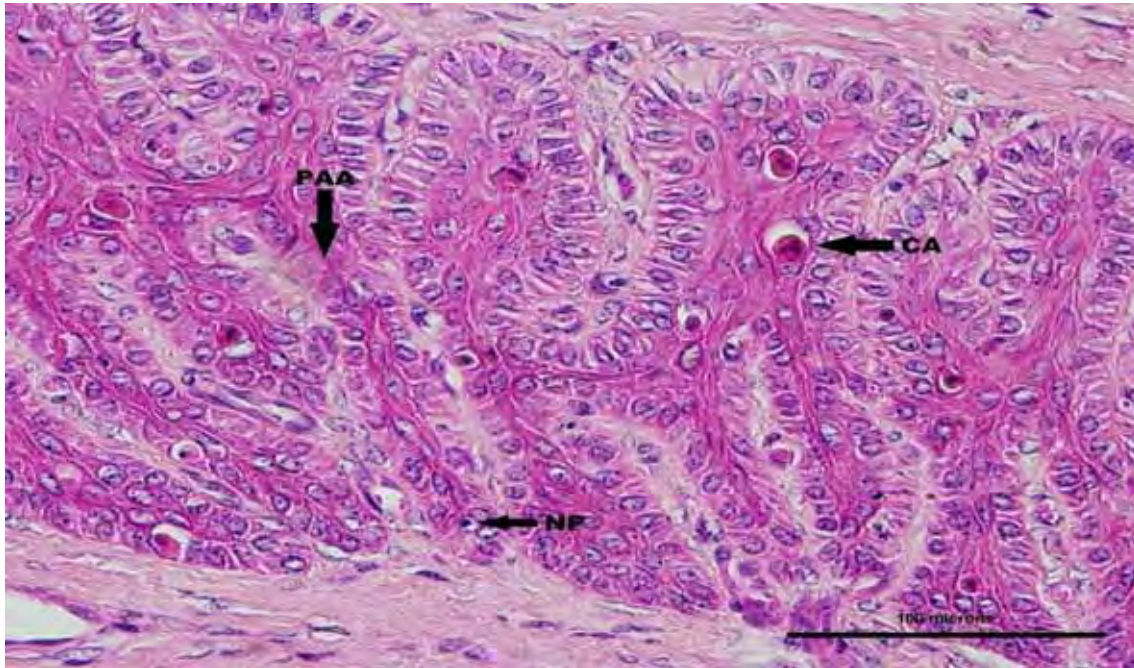


Figura 4. Fotomicrografia ilustrando a presença de células em apoptose (CA), núcleos picnóticos (NP), além do posicionamento anômico (PAA) das lâminas dérmicas e epidérmicas secundárias, em amostra de tecido laminar de equino submetido à obstrução intraluminal do cólon menor. A amostra foi obtida por meio de biópsia 72 horas após a desobstrução intraluminal (T72). Hematoxilina-Eosina, obj 40x. Jaboticabal 2013.

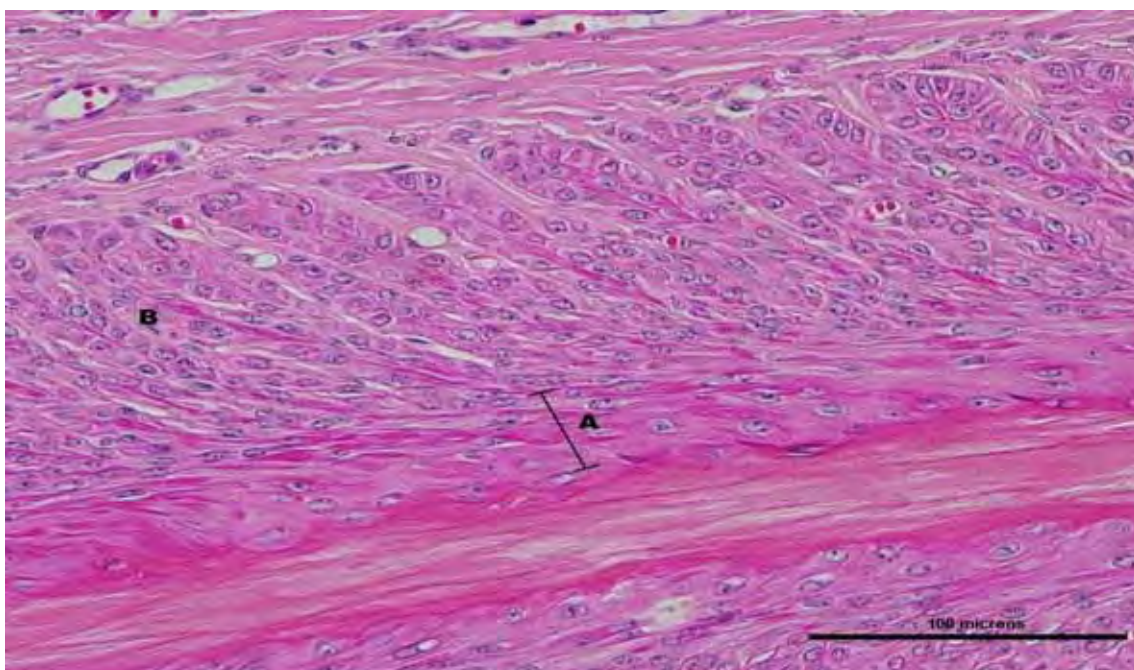


Figura 5. Fotomicrografia ilustrando a proliferação de queratinócitos entre a membrana basal e a porção queratinizada das lâminas (A) e o alongamento das lâminas epidérmicas secundárias (B), em amostra de tecido laminar de equino submetido à obstrução intraluminal do cólon menor. A amostra foi obtida por meio de biópsia 72 horas após a desobstrução intraluminal (T72). Hematoxilina-Eosina, obj 40x. Jaboticabal 2013.

A coloração com PAS possibilitou a visualização da membrana basal, conferindo a esta coloração carmim.

As amostras de tecido laminar do casco no momento T0, coradas com PAS, não apresentaram alterações, demonstrando membranas basais intactas, bem delineadas e sem qualquer interrupção (figura 6). Nas amostras colhidas no momento T4, não foram observadas alterações nas membranas basais de seis animais. As amostras de dois animais evidenciaram o início do afilamento da membrana basal no ápice das lâminas epidérmicas secundárias.

As alterações observadas no momento T72 consistem em lâminas epidérmicas secundárias com alongamento anormal e afilamento da membrana basal no ápice das lâminas epidérmicas secundárias (figura 7).

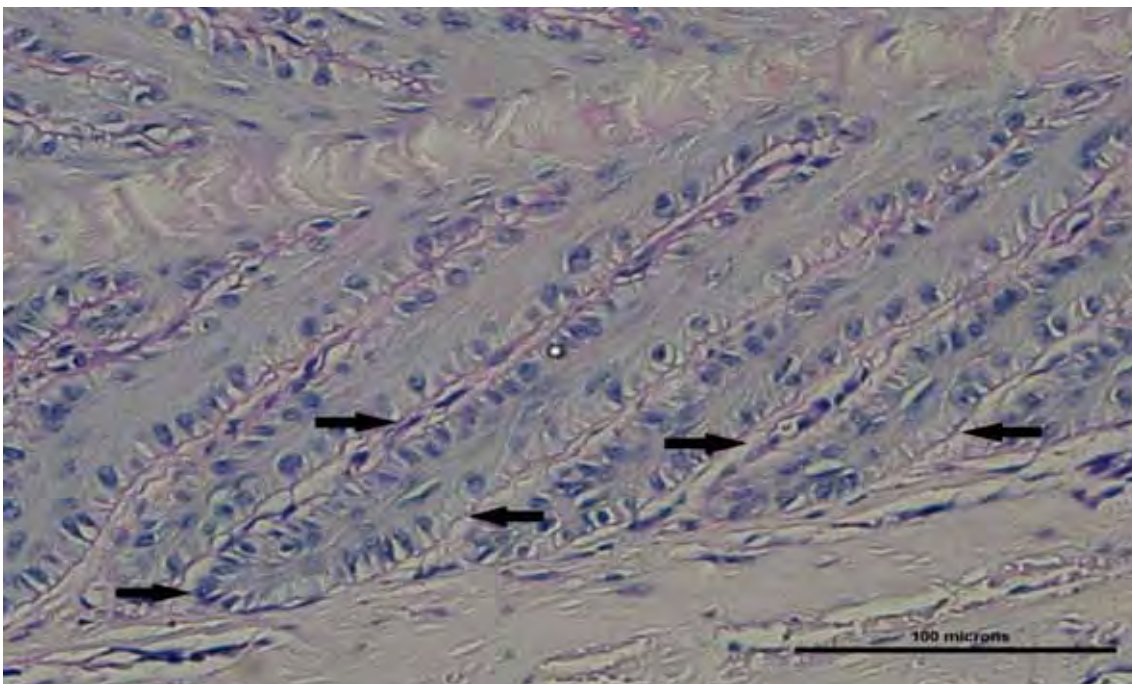


Figura 6. Fotomicrografia ilustrando a membrana basal (leve contorno de coloração carmim), indicada pelas setas em amostra de tecido laminar de equino, obtida por meio de biópsia no momento T0. Ácido Periódico-Schiff, obj 40x. Jaboticabal 2013.

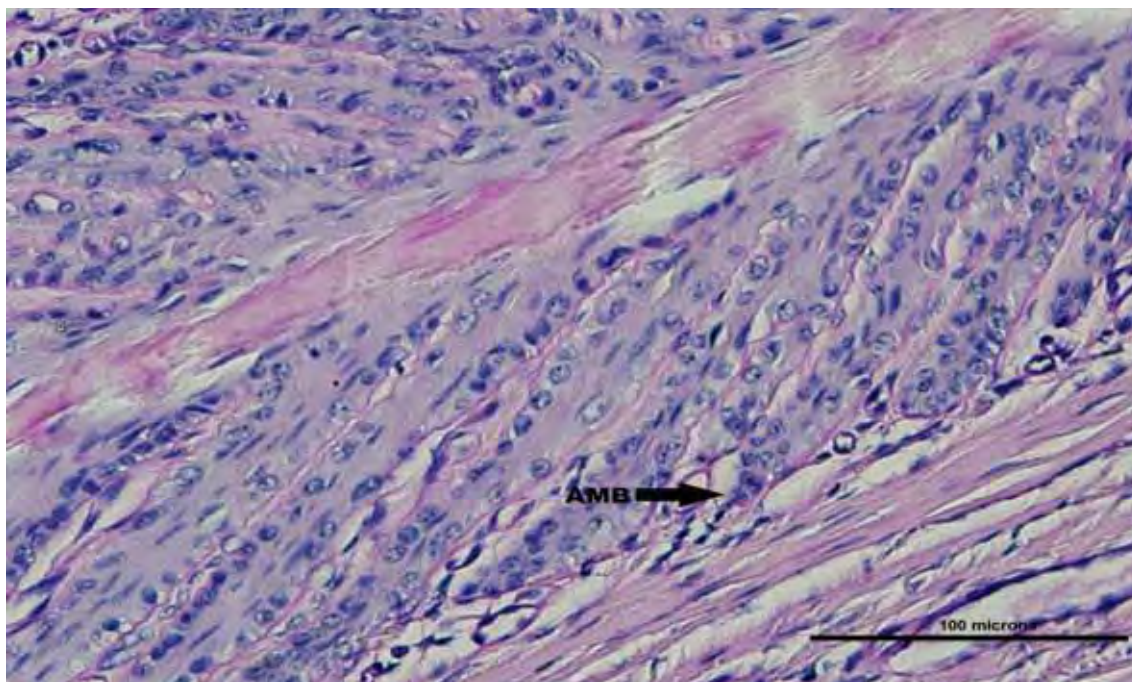


Figura 7. Fotomicrografia ilustrando o afinamento da membrana basal no ápice das lâminas epidérmicas secundárias (AMB), podendo ser observado também o alongamento das lâminas epidérmicas secundárias, em amostra de tecido laminar de equino submetido à obstrução intraluminal do cólon menor obtida por meio de biópsia 72 horas após a desobstrução intraluminal. Ácido Periódico-Schiff, obj 40x. Jaboticabal 2013.

5.2. Análise zimográfica

As metaloproteinases foram expressas em géis de zimograma (figura 8) por meio de bandas de diferentes pesos moleculares, expressas em Quilodalton (kDa). O programa computacional ImageJ expressou valores para as bandas correspondentes a cada uma das MMPs. A partir destes foram feitas as médias das quantidades das MMPs conforme tabela 1.

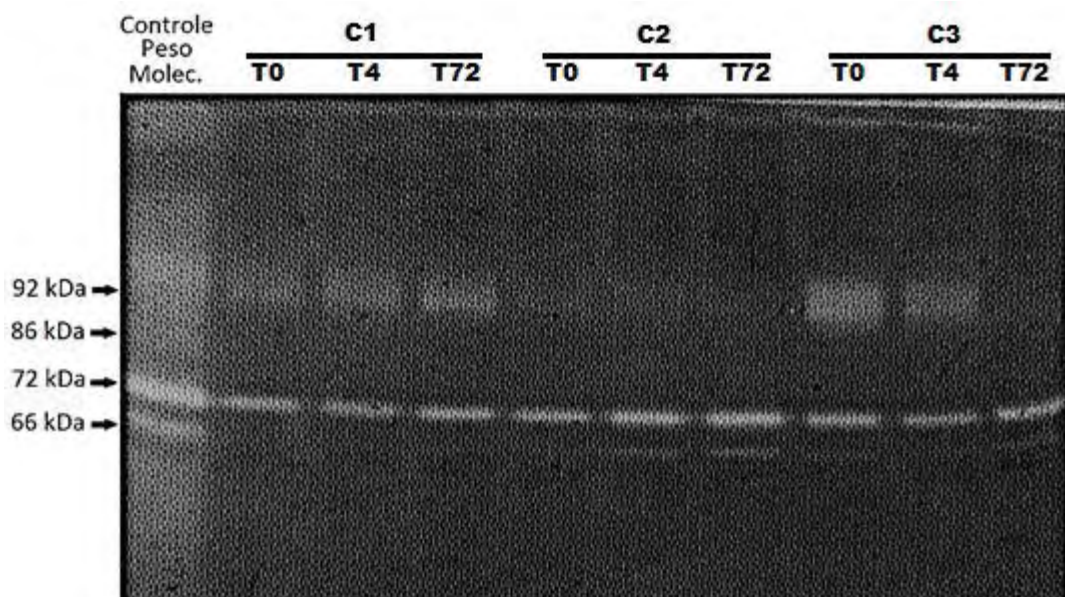


Figura 8. Zimograma representante das amostras de tecido laminar do casco, dos três momentos (T0, T4, T72) de três equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor (C1, C2, C3). Sendo a primeira coluna o controle de peso molecular (adenocarcinoma mamário canino), e em seguida as amostras de cada momento dos três equinos. Cada coluna demonstra as bandas correspondentes a cada uma das MMPs, diferenciadas através de seu peso molecular em kDa. Podendo ser notadas as bandas correspondentes a Pró-MMP-9 com 92 kDa, a pró-MMP-2 com 72 kDa e a MMP-2 ativa com 66 kDa. Nota-se a banda de MMP-9 ativa com 86 kDa somente na coluna correspondente ao controle de peso molecular, já que esta não foi detectada nas amostras de tecido laminar do casco.

A pró-MMP-2 foi detectada na maior parte das amostras analisadas, porém não houve diferença entre os momentos avaliados (figura 9).

A MMP-2 ativa foi detectada nos momentos T0 e T4, sendo detectada somente em algumas amostras do momento T72, entretanto não houve diferença significativa entre os momentos (figura 10).

A pró-MMP-9 foi detectada na maior parte das amostras dos momentos T0, T4 e T72, sem que houvesse diferença entre os momentos (figura 11). Já a MMP-9 ativa não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas, dentre todos os momentos.

Tabela 1. Valores das médias e desvio padrão da média da pro-metaloproteinase 9 (Pro-MMP-9), pro-metaloproteinase 2 (Pro-MMP-2) e metaloproteinase 2 ativa (MMP-2), expressas em unidades arbitrarias, obtidas do tecido laminar do casco de equinos (n=8) submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. Jaboticabal, 2013.

MMPs	T0		T4		T72	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
pró-MMP-2	27,4	21,7	35,8	16,4	37,9	7,6
MMP-2 ativa	0,3	1,7	0,7	0,9	2,1	1,5
pró-MMP-9	77,7	84,8	142,4	105,3	75,1	40,2

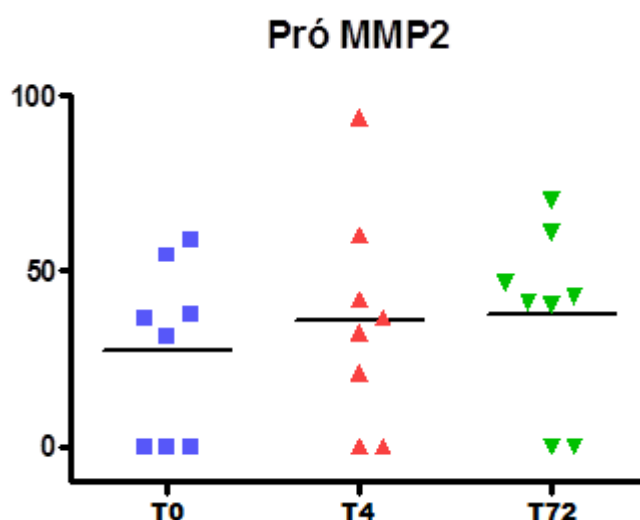


Figura 9. Valores individuais e média das concentrações da pró-MMP-2 expressas em unidades arbitrarias em amostras extraídas do tecido laminar do casco de equinos (n=8) submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. O tecido foi obtido por meio de biópsia antes (T0), imediatamente após a desobstrução intestinal (T4) e 72 horas após a desobstrução intestinal (T72). Jaboticabal 2013.

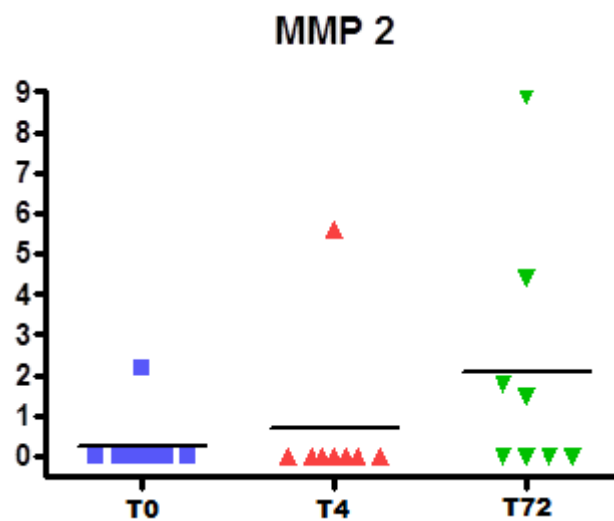


Figura 10. Valores individuais e média das concentrações da MMP-2 ativa expressas em unidades arbitrárias em amostras extraídas do tecido laminar do casco de equinos (n=8) submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. O tecido foi obtido por meio de biópsia antes (T0), imediatamente após a desobstrução intestinal (T4) e 72 horas após a desobstrução intestinal (T72). Jaboticabal 2013.

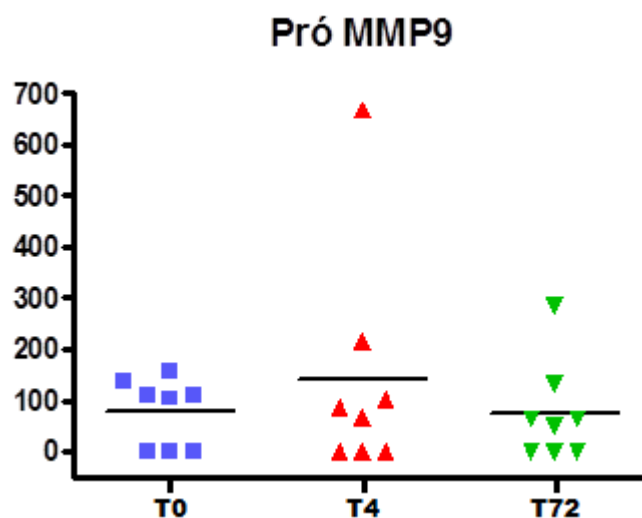


Figura 11. Valores individuais e média das concentrações da pró-MMP-9 expressas em unidades arbitrárias em amostras extraídas do tecido laminar do casco de equinos (n=8) submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. O tecido foi obtido por meio de biópsia antes (T0), imediatamente após a desobstrução intestinal (T4) e 72 horas após a desobstrução intestinal (T72). Jaboticabal 2013.

6. DISCUSSÃO

A semelhança do reportado por GRAVENA et al. (2012), neste trabalho as amostras dos tecidos laminares dérmico e epidérmico, colhidos pelo acesso transmural dorsal do casco, mostraram-se integras e viáveis tanto para análises histológicas como para determinação das MMPs.

Considerando que a pressão de 80 mmHg exercida pelo balão intraluminal ocluiu, ao menos parcialmente, os vasos responsáveis pela irrigação da parede intestinal, assim como comprometeu a drenagem venosa, acredita-se que a perfusão tecidual tenha ficado prejudicada no período de manutenção do balão, concretizando a ocorrência de isquemia. De outro lado, a desobstrução intraluminal ocorrida no momento T4 promoveu a reperfusão do segmento acometido. Diante disto, acredita-se que este evento tenha, possivelmente, levado a lesão de reperfusão, mesmo que em baixa intensidade, no segmento experimentalmente obstruído (ROWE & WHITE, 2002).

A lesão de reperfusão está relacionada ao reestabelecimento da oferta de oxigênio ao tecido, processo que tem a participação de células endoteliais e receptores aferentes presentes no tecido lesionado, conseqüentemente, leva a resposta inflamatória local que pode evoluir para sistêmica. Um dos fatores associados ao início das lesões de reperfusão no intestino é a produção de radicais livres de oxigênio (ERO), os quais, à medida que são liberados, levam à diminuição da produção de óxido nítrico, o que estimula a adesão e migração de neutrófilos. As mudanças na membrana das células endoteliais ocasionadas pelas lesões de isquemia e reperfusão levam à expressão de moléculas e receptores de adesão também relacionados à adesão e migração de neutrófilos através do endotélio de capilares e vênulas, ocasionando inflamação tecidual mais pronunciada devido à liberação pelos neutrófilos ativados, ERO e outras proteases da serina que atacam o colágeno e, conseqüentemente, as membranas celulares. A liberação sistêmica de citocinas e a ativação de neutrófilos circulantes podem levar a lesões em locais distantes à lesão inicial (SMITH, 2006). Deste modo pode-se pressupor que a lesão causada pela obstrução intraluminal ocasionou, por conseqüência, a liberação

sistêmica de mediadores inflamatórios, que ao atingirem o tecido laminar do dígito, ocasionaram o aparecimento de lesões nestes tecidos.

As alterações histológicas constatadas no tecido laminar do dígito representam a manifestação local da resposta inflamatória sistêmica, semelhante ao que ocorre nos órgãos em casos de sepsis humana, levando a ativação, adesão e migração de leucócitos através da parede vascular, gerando acentuada resposta inflamatória. E, levando-se em consideração que as células do tecido laminar não possuem grande resistência às alterações geradas pela alta produção de espécies reativas de oxigênio, ocasionada pela presença de leucócitos que se infiltram no tecido laminar durante os processos inflamatórios associados à laminite. Estas alterações são agravadas pelas grandes forças as quais estão submetidas às lâminas dérmicas e epidérmicas do casco. Desta forma pode-se dizer que os tecidos laminares sofrem mais intensamente a ação de mediadores inflamatórios liberados sistemicamente quando comparados a outros órgãos (BELKNAP et al., 2009).

No presente trabalho a MMP-2 ativa não apresentou alterações dentre os momentos estudados, diferentemente do encontrado por LOFTUS et al. (2009) em animais com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos, com amostras colhidas entre 36 e 48 horas após a indução da laminite e também em animais com laminite crônica agravada. JOHNSON et al. (1998) relataram elevação da MMP-2 ativa em animais acometidos por laminite em estudo comparativo entre animais com laminite clinicamente comprovada e animais saudáveis.

Relativamente aos valores de pró-MMP-2, não foram encontradas alterações entre os diferentes momentos estudados. Os valores encontrados para o momento T0 são semelhantes aos reportados por outros autores para equinos (MEDINA-TORRES et al., 2011). Diferença significativa nos valores de pró-MMP-2 nas amostras de animais que tiveram laminite induzida por sobrecarga de carboidratos não foram encontradas por outros autores (LOFTUS et al., 2009), à semelhança do encontrado neste trabalho.

Possivelmente as alterações nos valores da pró-MMP-2 e MMP-2 ativa não foram detectadas devido à baixa intensidade das lesões ocasionadas pelo método de obstrução, que provavelmente ocasionou a liberação de mediadores inflamatórios

para os tecidos laminares, porém não em quantidades suficientes para levar a aumento na liberação e ativação da pró-MMP-2 e MMP-2 ativa respectivamente.

JOHNSON et al. (1998) e LOFTUS et al. (2009), em seus respectivos trabalhos, relataram aumentos nos valores de pró-MMP-9. Diferentemente do reportado por MEDINA-TORRES et al. (2011), que encontraram diminuição nos valores da pró-MMP-9. No presente trabalho os valores da pró-MMP-9 não obtiveram alterações significativas. A presença da pró-MMP-9 está diretamente relacionada com a presença de citocinas pró-inflamatórias, as quais atraem células inflamatórias para o tecido laminar e ocasionam a liberação e ativação da pró-MMP-9 (CLUTTERBUCK et al., 2010), desta forma, a manutenção dos valores da pró-MMP-9 no presente estudo pode estar relacionada ao grau de lesão gerado pelo método de obstrução intestinal intraluminal, que causou isquemia parcial no segmento obstruído, levando a lesões, porém de baixa intensidade, o que ocasionou a liberação de mediadores inflamatórios sistêmicos em pequena quantidade, levando a menor liberação e ativação da pró-MMP-9 nas amostras de tecido laminar.

JOHNSON et al. (1998) e LOFTUS et al. (2009) em seus estudos realizados em animais com laminite não detectaram alterações nos valores da MMP-9 em sua forma ativa, contudo MEDINA-TORRES et al. (2011) em seu trabalho *in vitro* relataram aumento nos valores da MMP-9 ativa. Em nosso estudo a MMP-9 ativa não foi detectada em nenhum dos momentos experimentais, o que condiz com a pouca variação da pró-MMP-9 descrita anteriormente, pró-enzima que sofre clivagem proteolítica sendo ativada como MMP-9 ativa, deste modo, mesmo que tenha havido ativação da pró-MMP-9, esta ativação não foi significativa a ponto de ser detectada pelo método de análise zimográfica.

As lesões encontradas nas análises histológicas coradas tanto com HE quanto com PAS condizem com as classificadas como grau I (leves) por POLLITT (1996), que descreveu o alongamento da LES com pontas menos arredondadas que o normal, núcleo das células basais arredondados ao invés de ovalados, perda do posicionamento anatômico normal das LES e LDS, além de perda da simetria e continuidade da membrana basal, e presença de afilamento da MB no ápice das LES em forma de teto. No presente trabalho, as amostras de tecido laminar do casco colhidas no momento T72, coradas com HE, apresentaram alterações

histológicas características de laminite, como o alongamento das lâminas epidérmicas secundárias e o posicionamento anômico anormal das lâminas dérmicas e epidérmicas, além da presença de células em apoptose, núcleos picnóticos e a proliferação de queratinócitos. Já as amostras coradas com PAS apresentaram como principal alteração o afinamento da membrana basal no ápice das lâminas epidérmicas secundárias. As amostras basais, coradas com HE e PAS não tinham alterações, o que condiz com o quadro de higidez preconizado pelo estudo para a seleção dos animais utilizados no experimento, de modo que estes animais não possuíam alterações clínicas e radiográficas, características de histórico de laminite.

As amostras colhidas no momento T4 apresentaram poucas células em apoptose, leve perda do posicionamento anômico normal das lâminas dérmicas e epidérmicas e o início do afinamento da membrana basal no ápice das lâminas epidérmicas secundárias, lesões que podem ser consideradas iniciais e de pouca magnitude, as quais posteriormente evoluíram para as lesões características de laminite encontradas nas amostras do momento T72. Possivelmente, o aparecimento de lesões iniciais ainda não agravadas, encontradas em T4, momento da desobstrução intraluminal, se deva ao pouco tempo decorrido após a reperfusão tecidual do segmento intestinal obstruído, que só ocorreu após a desobstrução e provavelmente desencadeou a liberação de mediadores inflamatórios relacionados ao aparecimento de lesões no tecido laminar do casco.

Em trabalho desenvolvido por CROSER & POLLITT (2006) com animais que sofreram a indução de laminite por sobrecarga de carboidratos, e tiveram amostras de tecido laminar colhidas por meio de biópsias, foram relatadas lesões muito semelhantes às encontradas no presente trabalho, sendo o início do aparecimento destas lesões relatado após 12 horas da indução da laminite, com posterior agravamento destas lesões, tanto em gravidade quanto em extensão, nas amostras obtidas posteriormente a cada seis horas até a eutanásia dos animais ocorrida após 48 horas da indução.

Deste modo supõe-se que maior número de colheitas seriadas após o momento de desobstrução intestinal, evidenciaria evolução gradual das lesões até o momento T72. Entretanto, tal procedimento não pode ser realizado devido a grande

quantidade de biópsias necessárias, o que poderia levar a perda da integridade do casco.

Em trabalho que avaliou o tecido laminar de equinos acometidos com síndrome cólica de ocorrência natural que evoluíram para óbito, LASKOSKI et al. (2009) relataram lesões classificadas segundo POLLITT (1996) como de grau I até III, sendo as lesões de grau I semelhantes as encontradas no presente trabalho. Embora o período de evolução destas lesões não tenha diferido das encontradas no momento T72 desta pesquisa, o fato dos animais avaliados terem evoluído para óbito faz supor que desenvolveram lesões mais graves que as apresentadas pelos animais de nossa pesquisa, os quais, embora tenham demonstrado quadro de inflamação sistêmica esta provavelmente foi de caráter leve.

7. CONCLUSÃO

A indução experimental de obstrução intraluminal do cólon menor foi responsável pelo surgimento de lesões de grau leve no tecido dérmico e epidérmico laminar do casco equino. Contudo não levou a alterações nos valores de pró-MMP-2, MMP-2-ativa, Pró-MMP-9 e MMP-9-ativa, no tecido laminar do casco.

Entretanto, estudos complementares acerca da liberação de mediadores inflamatórios sistêmicos, que levam a ocorrência de lesões e a liberação e ativação das MMPs no tecido laminar do casco equino devem ser realizados para melhor compreensão do assunto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AROSALO, B.M.; RAEKALLIO, M.; RAJAMAKI, M.; HOLOPAINEN, E.; KASTEVAARA, T.; SALONEN, H.; SANKARI, S. Detecting early kidney damage in horses with colic by measuring matrix metalloproteinase -9 and -2, other enzymes, urinary glucose and total proteins. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49, p.4-9, 2007.

BAILEY, S.R.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. **The Veterinary Journal**, v.167, p.129–142, 2004.

BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2.Ed. São Paulo: Manole, p. 410-416, 1991.

BEHRE, G.; SCHEDEL, I.; NENTWIG, B.; WORMANN, B.; ESSINK, M.; HIDDEMANN, W. Endotoxin concentration in neutropenic patients with suspected gram-negative sepsis: correlation with clinical outcome and determination of anti-endotoxin core antibodies during therapy with polyclonal immunoglobulin M-enriched immunoglobulins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 36, p. 2139-2146, 1992.

BELKNAP, J. K.; GIGUERE, 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, p.42–47, 2007.

BELKNAP, J. K.; MOORE, J. N.; CROUSER, E. C. Sepsis—From human organ failure to laminar failure. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, p.155–157, 2009.

CÉLESTE, C. J.; SZÖKE, M. O. Management of Equine Hoof Injuries. **Veterinary Clinical Equine**, v.21, p.167-190, 2005.

CLUTTERBUCK, A. L.; HARRIS, P.; ALLAWAY, D.; MOBASHERI, A. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinary Journal**, v. 183, p.27-38, 2010.

CORRÊA, R.R.; ZOPPA, A.L.V.; SILVA, L.C.L.C.; FERNANDES, W.R.; BACCARIN, R.Y.A.; CRUZ, R.S.F.; FANTONI, D. T. Estudo retrospectivo dos casos de enterolitíase e corpo estranho em intestino grosso de equinos, no período de janeiro de 1993 a janeiro de 2003. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.2, p.242-249, 2006.

CROSER, E. L.; POLLITT, C. C. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. **52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, San Antonio. v.52, p.542-546, 2006.

DARADKA, M.; POLLITT, C.C. Epidermal cell proliferation in the equine hoof wall. **Equine Veterinary Journal**, v.36, p.236–241, 2004.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 609-614, 2010.

FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G.; ALESSI, A.C.; SAQUETTI, C.H.C.; RASERA, L. Effect of intraluminal distention on microvascular perfusion in the equine small colon. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.9, p. 1292-1297, 2002.

FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G.; ALVES, G.E.S.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; MOORE, R.M. Local and remote lesions in horses subjected to small colon distension and decompression. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.72, p. 68-76, 2008.

GRAVENA, K.; SAMPAIO, R. C. L.; DIAS, D. P. M.; CANOLA, P. A.; PEIRÓ J. R. LACERDA-NETO, J. C. Evaluation of the integrity of horse hoof dermal and epidermal tissues collected by dorsal transmural access. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, n. 12, p. 858-862, 2012.

HANDLY, B. K.; STOKES, A. M.; BELL, A. M.; JOHNSON, J.R.; KEOWEN, M.L.; PAULSEN, D.B., SOG, G.A., MOORE, R.M. Use of serial laminar tissue collection via biopsy in conscious healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.70 p.697-702, 2009.

HOOD, D.M. Endotoxemia as a direct cause of laminitis. **41st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Proceedings**, Lexington. p. 245-246, 1995.

JEFFCOTT, L. B. **Manual Merck de Veterinária**. 8Ed. São Paulo: Roca, p.671-672, 2001.

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. **Veterinary Record**, v.142, p.392-396, 1998.

JONES, W.E. **Genética e Criação de Cavalos**. Roca, cap. 1, p.3-19, 1987.

KING, J.N.; GERRING, E.L. Detection of endotoxin in cases of equine colic. **Veterinary Record**, v. 123, p. 269-271, 1988.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos-Texto e Atlas Colorido**. Porto Alegre: Artmed, v.1. p.148-170, 2002.

KÖNIG, H. E., LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos-Texto e Atlas Colorido**. 4Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 667-677, 2011.

KUESIS, B.; SPIER, S. J. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.550-560, 2000.

LASKOSKI, L. M.; VALADÃO, C. A. A.; VASCONCELOS, R. O.; PEREIRA, R. N.; DIAS, A. D. P. U.; ALESSI, A. C. Alterações morfológicas de tecido laminar do casco e parâmetros clínicos e laboratoriais de equinos com síndrome cólica letal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.731-735, 2009.

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 and Immunopathology**, v.129, p.221-230, 2009.

MEDINA-TORRES, C. E.; MASON, S. L.; FLOYD, R. V.; HARRIS, P. A.; MOBASHERI, A. Hypoxia and a hypoxia mimetic up-regulate matrix metalloproteinase 2 and 9 in equine laminar keratinocytes. **The Veterinary Journal**, v.190, p.54-59, 2011.

MENZIES-GOW, N.J.; BAILEY, S.R.; KATZ, L.M.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Endotoxin induced digital vasoconstriction in horses: associated changes in plasma concentrations of vasoconstrictor mediators. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, p.273–278, 2004.

MISHRA, P. C.; LEACH, D. H. Extrinsic and intrinsic veins of the equine hoof wall. **Journal of Anatomy**, v. 136, p. 543-560, 1983.

MOORE, J. N. **Manual Merck de Medicina Veterinária**. 8Ed. São Paulo: Roca, p. 137-149, 2001a.

MOORE, J.N. A perspective on endotoxemia. **47th Annual Convention of American Association of Equine Practitioners. Proceedings**, San Diego. v. 47, p. 61-74, 2001b.

MOORE, J.N.; ALLEN, D. Jr.; CLARK, E.S. Pathophysiology of acute laminitis. **The Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, v.5, n.1, p.67-72, 1989.

MOORE, R.M.; MUIR, W.W.; GRANGER, D.N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and therapeutic interventions: a review and its implications in the horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.9, p.115-132, 1995.

MORGAN, S.J.; HOOD, D.M.; WAGNER, I.P.; POSTL, S.P. Submural histopathologic changes attributable to peracute laminitis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, p.829–834, 2003.

NAGASE, H.; WOESSNER, J.R.F. Matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, n.31, p.21491–21494, 1999.

PEIRÓ, J.M.; MENDES, L.C. Semiologia do sistema digestório equino. **Semiologia veterinária: A arte do diagnóstico**, São Paulo: Roca, p.139-175, 2004.

POLLITT, C. C. Clinical anatomy and physiology of the normal equine foot. **Veterinary Continuing Education, Massey University**, v.129, p.1-47, 1990.

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

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

POLLITT, C. C. **Color atlas of the horse's foot**. Barcelona: Mosby-Wolfe, 1995.

POLLITT, C. C. Anatomy and physiology of the inner hoof wall. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.3, p.3-21, 2004a.

POLLITT, C. C. Microscopic Anatomy and Physiology of the Hoof. **Equine Podiatry**, p.90-101, 2004b.

POLLITT C. C.; PASS M. A.; POLLITT S. Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**. v.26, p.119-124, 1998.

RAFFETTO, J.D.; KHALIL, R.A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v.75, p.346–359, 2008.

ROWE, E. L.; WHITE, N. A. Reperfusion injury in the equine intestine. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.1, n.3, p. 148-162, 2002.

SELLNER, J.; LEIB, S.L. In bacterial meningitis cortical brain damage is associated with changes in parenchymal MMP-9/TIMP-1 ratio and increased collagen type IV degradation. **Neurobiology of Disease**, v.21, p.647–656, 2006.

SMITH, B. P. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3Ed. Barueri: Manole, p.108-111; 625-629; 1116-1122, 2006.

STASHAK, T. S. **Claudicação em equinos segundo Adams**. 2Ed. São Paulo: Roca, p.1-10, 2006.

URIU, K.; OSAJIMA, A.; HIROSHIGE, K.; WATANABE, H.; AIBARA, K.; INADA, Y.; SEGAWA, K.; ANAI, H.; TAKAGI, I.; ITO, A.; KAMOCHI, M.; KAIZU, K. Endotoxin removal by direct hemoperfusion with Na absorbant column using polymixin B-immobilized fiber ameliorates systemic circulatory disturbance in patients with septic shock. **American Journal of Kidney Disease**, v. 39, p. 747-937, 2002.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v.92, p.827–839, 2003.

VU, T.H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes & Development**, v.14, p.2123-2133, 2000.

WOESSNER Jr, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB Journal**, v.5, n.8, p.2145-2154, 1991.