

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

**LAMINITE EXPERIMENTAL: ASPECTOS MORFOLÓGICOS,
MORFOMÉTRICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DAS LÂMINAS
DÉRMICAS E EPIDÉRMICAS DO CASCO DE EQÜINOS
TRATADOS COM A TRINITROGLICERINA**

Rita de Cássia de Lima Sampaio
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO
Novembro de 2007

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

**LAMINITE EXPERIMENTAL: ASPECTOS MORFOLÓGICOS,
MORFOMÉTRICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DAS LÂMINAS
DÉRMICAS E EPIDÉRMICAS DO CASCO DE EQUINOS
TRATADOS COM A TRINITROGLICERINA**

Rita de Cássia de Lima Sampaio

Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO
Novembro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RITA DE CÁSSIA DE LIMA SAMPAIO – nascida em 22 de maio de 1970, em Belém – PA. Em outubro de 1998, graduou-se em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), atualmente Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) – Belém – PA. Mestre em Cirurgia Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal – UNESP, sob orientação do Prof. DR. José Corrêa de Lacerda Neto. Em agosto de 2003, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária, nível Doutorado, sob orientação do Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto.

EPÍGRAFE

Só nós paraenses sabemos...

Tem coisas que só o paraense, seja ele de nascimento ou por adoção, sabe o que é: Passar numa esquina, e salivar só de sentir o cheiro do tucupi, ou da maniçoba, empinar papagaio do cobra; ou fazer pacientemente, com talinhas de palmeira e papel de seda, uma curica pra os filhos brincarem.

Paraense joga peteca, não bola de gude, tem seguro contra as mangas que quebram os pára-brisas dos carros, pena que não tem seguro pra cabeça, eu mesma já fui alvo delas...

Paraense conhece mato, marés, conta a estória do boto, moço bonito, mas com um pitiú de peixe, mas que mesmo assim, encanta as moçoilas mais desavisadas nas noites de lua cheia, não sabe o que é pitiú? O paraense sabe!...

Por aqui tomamos açaí pra dormir a sesta, com farinha d'água ou de tapioca, com açúcar ou sem, com charque, pirarucu ou sem nada só ele purinho, bom que só...

Tomamos banho de rio, barrento como o Guamá ou a baía do Guajará, de rio azul transparente como o Tapajós, de Igarapé gelado de bater o queixo de frio...

Somos índios, místicos, curandeiros, mas também com toda esta energia de águas e mata não poderia ser de outro jeito, paraense vai ao Vêr-o-Peso, compra ervas, faz chá, garrafada, banho de cheiro, uma delícia! Curas de corpo e de alma.

Somos orgulhosos por sermos assim essa mistura morena, brejeira e gostosa, por sermos autênticos, pela cultura que temos, por nosso sangue do índio que a tantos outros se misturou e que nos faz muito, mas muito especiais!

(Adaptado do texto de Cândida Maria)

DEDICATÓRIA

Ao Yuri,

Querido esposo, amigo companheiro, por me apoiar com todo carinho e paciência em todos os meus passos de crescimento científico, pessoal e profissional e principalmente por acreditar e embarcar em meus sonhos malucos.

A Maria do Carmo,

Minha mãe, sem ela não teria chegado até aqui, foi quem sempre me deu forças para ir em frente e não me deixou desistir.

Ao meu irmão Diego e minha tia Nazaré,

Agradeço a vocês pelo carinho, apoio e paciência para me ajudar em todas as etapas.

Aos cavalos,

Eles são os responsáveis de hoje eu ser Veterinária e principalmente ao Mohammed pelos anos de companhia e realização de um sonho e agora ao Red, Skol, Piatam, Clássica, Turquesa e All Beauty.

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho,

Especialmente ao meu orientador, Professor Doutor **José Corrêa de Lacerda Neto**, por ter me aceitado e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa científica, pela grande paciência e dedicação, além da sua valiosa orientação, sempre em tempo integral. Pelo exemplo de pessoa e orientador e pelo primor científico com que guia seus passos. Muito obrigada.

Agradeço a Professora Doutora **Silvana Martinez Baraldi Artoni** pela co-orientação, confiança e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Clínica Médica Veterinária e Patologia Veterinária e ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, pela colaboração, em especial a **Renata Nagib Jorge** pela paciência durante estes anos.

Agradeço ao **Antônio Carlos Homem** e a **Cláudia Aparecida Rodrigues**, técnicos do Laboratório de Microscopia, pela convivência nestes anos.

A todos os setores da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, em especial à seção de pós-graduação e à biblioteca.

Agradeço especialmente a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal pela oportunidade de realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
Capítulo 1	
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
I. ANATOMIA DO DEDO.....	01
1.1 Forças transferidas através do casco.....	06
1.2 Fisiologia vascular digital normal.....	07
1.2.1 Controle do tônus do músculo liso vascular.....	08
1.2.2 Mecanismo de contração.....	09
1.2.3 Mecanismo de relaxamento.....	09
II. INTRODUÇÃO A LAMINITE.....	10
2.1 Estágios da laminite.....	12
2.2 Sinais clínicos.....	13
2.3 Modelos de indução da laminite aguda.....	13
2.3.1 Modelo da sobrecarga de carboidratos (CHO).....	14
2.3.2 Modelo do extrato da noqueira preta.....	18
2.3.3 Modelo da Frutana (Oligofrutose – OF).....	21
2.4 Teorias da Patogenia.....	21
2.4.1 Teoria Isquêmica/vascular.....	22
2.4.2 Teoria Mecânica/traumática.....	24
2.4.3 Teoria Metabólica/enzimática.....	24
III. ÓXIDO NÍTRICO.....	26
IV. REFERÊNCIAS.....	30

Capítulo 2

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS LÂMINAS DÉRMICAS E EPIDÉRMICAS DO CASCO DE EQUINOS COM LAMINITE EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TRINITROGLICERINA.....	38
RESUMO.....	38
I. INTRODUÇÃO.....	40
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 Animais.....	44
2.2 Análises histológicas.....	45
2.3 Morfometria.....	45
2.4 Análise estatística.....	46
III. RESULTADOS.....	46
IV. DISCUSSÃO.....	53
V. CONCLUSÃO.....	59
VI. REFERÊNCIAS.....	60

Capítulo 3

LAMINITE EQUINA EXPERIMENTAL: ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL EMORFOMÉTRICO DAS LÂMINAS DÉRMICAS E EPIDÉRMICAS DO CASCO TRATADOS COM TRINITROGLICERINA.....	64
RESUMO.....	64
I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	65
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1 Animais.....	70
2.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	71
2.3 Morfometria.....	72
2.4 Análise estatística.....	72
III. RESULTADOS.....	73
3.1 Análise morfométrica.....	73

3.2	Análise ultra-estrutural do tecido lamelar.....	74
3.2.1	Grupo Controle.....	74
3.2.2	Grupo Laminite.....	76
3.2.3	Grupo Laminite +Trinitroglicerina.....	76
IV.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	81
V.	REFERÊNCIAS.....	86

Capítulo 4

LAMINITE EQUINA EXPERIMENTAL: ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL E MORFOMÉTRICA DOS HEMIDESMOSSOMOS.....		89
	RESUMO.....	89
I.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	91
II.	MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1	Animais.....	95
2.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	96
2.3	Morfometria.....	97
III.	RESULTADOS.....	98
IV.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	102
V.	REFERÊNCIAS.....	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração da composição das lâminas epidérmicas secundárias do casco de eqüinos normais, mostrando o estrato espinhoso (EE), precursores de queratinócitos (PQ), zona queratogena (ZQ) e célula basal (CB) (HE – Aumento de 100x)..... 06
- Figura 2 - A hipótese do ciclo de feedback positivo proposto como um componente da fase aguda da síndrome da laminite (HOOD, 1980)..... 12
- Figura 3 – Fotomicrografias – Em A - Aspecto histológico das lâminas epidérmicas do casco de eqüinos do Grupo Controle, onde se visualiza a queratinização das LEP e o contorno regular das LES. A linha azul indica o comprimento e a largura da LEP e a marcação utilizada para sua determinação (HE - obj. 4x). Em B observa-se o aspecto histológico das lâminas epidérmicas do casco de eqüinos do Grupo Controle (GI), ilustrando a queratinização das LEP e o contorno regular das LES, LES paralelas entre si com seus ápices arredondados (setas), largura das LEP (linha azul) (HE - obj. 20x). Em C e D observa-se o aspecto histológico das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de eqüinos do Grupo Controle, visualizando-se a diferença de comprimento e largura (linha azul) entre as LES e as LDS, o formato em bastão das LES, a presença de queratinócitos (Q) nas LES e os núcleos basais de formato oval dispostos no ápice das células basais (CB) (seta) (Figura C –HE – obj. 40x) (Figura D - HE – obj. 60 x)..... 49
- Figura 4 - Fotomicrografias dos eqüinos dos Grupos Laminite e Laminite+Trinitroglicerina. Em A ilustra-se aparente retração com queratinização da base das lâminas epidérmicas primárias nos eqüinos

do Grupo Laminite (seta) (HE – obj. 4x). Em B, imagem do Grupo Laminite+Trinitroglicerina com células em fase de queratinização (seta), aparente retração da lâmina epidérmica primária (LEP) devido à queratinização avançada das células basais na base da LEP (cabeça de seta) (HE - obj. 20x). Em C, espaços vazios entre a lâmina epidérmica primária (LEP) e a lâmina dérmica primária (LDP), indicativo de retração e lesões lamelares (seta) (HE – obj. 40x). Em D, perda de arquitetura das lâminas epidérmicas secundárias (LES), células basais (CB) com os núcleos arredondados ou de forma irregular, presença de material amorfo constituído aparentemente de fibrina, hemácias e leucócitos aderidos ao endotélio vascular (seta) na LDS (HE – obj. 100x). 50

Figura 5 - Área da célula e do núcleo, assim como a porcentagem ocupada pelo núcleo na célula, nos três grupos de eqüinos estudados: Controle

■, Laminite ■ e Laminite + Trinitroglicerina ■ 74

Figura 6 - Eletromicrografia de transmissão das lâminas epidérmicas secundárias de cascos de eqüinos do grupo I (Grupo Controle). Em A as lâminas epidérmicas secundárias (LES), presença de células basais (*) com o seu núcleo em formato oval, situados no ápice da célula em posição oposta a membrana basal e a lâmina dérmica secundária (LDS) separando duas LES e queratinócitos no meio das lâminas epidérmicas secundárias (Q) (aumento de 2000µm). Em B a membrana basal é uma linha contínua sem rupturas contornando completamente as lâminas epidérmicas secundárias e penetrando profundamente em suas criptas. As células basais (queratinócitos) estão conectadas à derme pela zona de membrana basal (junção dermoepidérmica). Em C presença de hemidesmosomos (seta) acompanhando a membrana basal em todo o seu percurso, núcleo da célula basal (N) (aumento de

20000 μ m). Em D observam-se duas regiões da membrana basal: uma lâmina lúcida (seta), eletro-esparsa, abaixo das células basais (queratinócitos), e a outra, a lâmina densa ou basal (cabeça de seta) (aumento de 20000 μ m).....

78

Figura 7 - Eletromicrografia de transmissão das lâminas epidérmicas secundárias de cascos de eqüinos do grupo II (Grupo Laminite). A - Ausência de núcleos em várias células (*). Aumento de 5000 μ m. B - Lâmina epidérmica secundária estreita e sem células basais (*). Aumento de 5000 μ m. C - Células basais com núcleos de formatos arredondados (*), localizados próximo à membrana basal, que se encontra ondulada (seta). Aumento de 7500 μ m. D Núcleos de forma irregular (N), e lâmina epidérmica secundária alterada, na qual ilustra-se sua queratinização (seta). Aumento de 7500 μ m.....

79

Figura 8 - Eletromicrografia de transmissão das lâminas epidérmicas secundárias de cascos de eqüinos do grupo III (Grupo Laminite+TNG). Na figura A visualiza-se as lâminas epidérmicas secundárias (LES) e lâminas dérmicas secundárias (LDS), com ausência de células basais (*) ilustrando em muitos lugares, a membrana basal separada da LES (seta) (aumento 3000 μ m). Figura B apresenta células basais (*) com os seus núcleos globosos (aumento de 5000 μ m). Na figura C observam-se duas regiões: uma lâmina lúcida, eletro-esparsa, abaixo dos hemidesmossomos (seta), e a outra, a lâmina densa ou basal (cabeça de seta) mais espessa. Regiões com descolamento da membrana basal e ausência de hemidesmossomos (*) (aumento de 10000 μ m). A figura D ilustra a presença de hemidesmossomos (seta) e o descolamento da membrana basal das células basais (*) (aumento de 20000 μ m).....

80

Figura 9 - Eletromicrografia de transmissão dos eqüinos do Grupo Controle. Em A lâmina epidérmica secundária (LES), lâmina dérmica secundária (LDS) e o núcleo basal (N), presença de hemidesmosomos (seta). Aumento de 10µm. Em B lâmina epidérmica secundária (LES) e a lâmina dérmica secundária (LDS) entre elas a presença de hemidesmosomos (seta). Aumento de 40µm. Em C núcleos das células basais (N) e a junção de duas células e a placa de desmosomos (setas). Aumento de 40µm. Em D lâmina epidérmica secundária (LES), lâmina dérmica secundária (LDS), os hemidesmosomos (seta) acompanhando a membrana basal e os filamentos de ancoragem (*) atravessando o espaço da lâmina lúcida para aderir-se à lâmina densa (cabeça de seta). Aumento de 60µm.....

100

Figura 10 - Eletromicrografia de transmissão dos eqüinos do Grupo Laminite. Em A células basais com separação (seta) e rompimento da membrana basal (*). Aumento de 10µm. Em B perda de hemidesmosomos e a separação da lâmina epidérmica secundária (LES) (seta) da membrana basal (cabeça de seta). Aumento de 15µm. Grupo Laminite + Trinitroglicerina - em C ausência de células basais nas lâminas epidérmicas secundárias LES, membrana basal (seta) contornando a lâmina dérmica secundária (LDS). Aumento de 10µm. Em D lâmina epidérmica (LES) unida à lâmina dérmica secundária (LDS) pelos hemidesmosomos (seta), presença de desmosomos (cabeça de seta) unindo o queratinócito (Q) a restos celulares. Aumento de 15µm.....

101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média $\pm$ EPM do comprimento e largura das lâminas epidérmicas dos membros torácicos e membros pélvicos dos Grupos Controle, Laminite e Laminite+Trinitroglicerina.....	52
Tabela 2 - Áreas médias da célula e do núcleo, assim como a porcentagem que o núcleo ocupa na célula basal das lâminas epidérmicas secundárias dos eqüinos do Grupo Controle, Grupo Laminite e Grupo Laminite+Trinitroglicerina $\pm$ EPM.	73
Tabela 3 - Média $\pm$ EPM do número, comprimento e diâmetro dos hemidesmosmos (HD), assim como HD por μm^2 e a porcentagem de HD por área de plasmalema, de casco de eqüinos dos grupos Controle, Laminite e do grupo Laminite + Trinitroglicerina, durante o período estudado.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

CHO – carboidrato

TNG – trinitroglicerina

5-HT – 5-Hidroxitriptamina

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintetase

LEP – lâmina epidérmica primária

LES – lâmina epidérmica secundária

LDP – lâmina dérmica primária

LDS – lâmina dérmica secundária

MB – membrana basal

CB – célula basal

HDs – hemidesmossomos

FAs – filamentos de ancoragem

HE – hematoxilina eosina

PAS – ácido periódico de Schiff

AVAS – anastomoses artério-venosas

PGF_{2α} – prostaglandina F 2α

ET-1 – endotelina 1

NB – número de hemidesmossomos por µm de MB

NS – densidade numérica de hemidesmossomos por µm de MB

B_{HD} – comprimento de hemidesmossomos

HDT – diâmetro dos hemidesmossomos

% Área HD – porcentagem de área do plasmalema basal da célula ocupada pelos HDs

MMP (MMP9, MMP2) – metaloproteinases

OF - oligofrutose

Laminite Experimental: aspectos morfológicos, morfométricos e ultra-estruturais das lâminas dérmicas e epidérmicas do casco de eqüinos tratados com trinitroglicerina.

RESUMO – As alterações ultra-estruturais ocorridas nas lâminas epidérmicas e dérmicas de eqüinos com laminite são responsáveis pela rotação ou afundamento da falange distal dentro do casco. Com o objetivo de prevenir esta ocorrência foram estudados os efeitos da sobrecarga de carboidratos (SCHO), assim como da utilização de trinitroglicerina na fase prodrômica da laminite, nas lâminas epidérmicas do casco de quinze eqüinos. A indução da laminite por meio da sobrecarga de carboidratos alterou significativamente as lâminas epidérmicas primárias e secundárias dos cascos dos eqüinos dos grupos induzidos (Grupo Laminite e Grupo Laminite + Trinitroglicerina) em comparação com o Grupo Controle, causando retração das lâminas epidérmicas primárias, alongamento das lâminas epidérmicas secundárias e estreitamento das lâminas epidérmicas primárias e secundárias. A indução da laminite por meio da sobrecarga de carboidratos diminuiu significativamente a área da célula basal assim como a área do núcleo dos dois grupos induzidos (Grupo Laminite e Grupo Laminite + Trinitroglicerina) em comparação com o grupo controle. Foi observado, pela análise estatística, que o Grupo Laminite obteve maior redução das áreas, tanto da célula como do núcleo, porém a porcentagem de ocupação do núcleo na célula não foi diferente nos dois grupos induzidos. Na avaliação histopatológica, foram observadas lesões lamelares nos grupos Laminite e Laminite + Trinitroglicerina, características de processo degenerativo das lâminas epidérmicas. Ocorreram diminuições nos números de hemidesmosomos dos grupos induzidos quando comparados com o Grupo Controle. A administração de trinitroglicerina não foi capaz de impedir o desenvolvimento de lesões nas lâminas epidérmicas e dérmicas, assim como, nas células basais e membrana basal em cavalos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos.

Palavras-chaves: Laminite, óxido nítrico, hemidesmosomos, membrana basal, eqüinos.

**Experimental Laminitis: morphometric, morphological and
ultrastructural aspect of dermal and epidermal lamellae equine hoof
treated with glyceryl trinitrate.**

ABSTRACT - Disruption of the lamellar ultrastructural is responsible for a cellular failure, that culminates in distal rotation of the distal phalanx within the hoof. Aiming to prevent such debilitating condition, effects of carbohydrate overload and glyceryl trinitrate (TNG) use during the prodromal stages of experimentally induced laminitis in fifteen horses hoof were studied. Laminitis induced by grain overload affected significantly primary and secondary lamellar structure from horse's hoof (Group II and III), which in turn led to primary epidermal retraction, basal cells became elongated and both primary and secondary epidermal lamellae clump together when compared to control group (GI). Equine that developed laminitis induced by carbohydrate overload had a significant reduction in basal cell nucleus in both GII and GIII groups, when compared to horses from GI. Horses from GII group had higher reduction in areas relative to both cell and nucleus, however, the percentage of nucleus position within cell was not different in both horses groups (GII and GIII). Histopathology of hooves revealed lamellae lesions in both horses groups (GII and GIII), characterized by a degenerative process present on epidermal lamellae. Lower number of hemidesmosome in both GII and GIII groups were observed. The administration of TNG was unable to prevent the development of lesions lamellae epidermal and dermal, as in the epidermal basal cells and the basement membrane in horses with laminitis induced by carbohydrate overload.

KEYWORDS: Laminitis, nitric oxid, hemidesmossome, basement membrane, equine.

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS

I. ANATOMIA DO DEDO

A evolução do cavalo foi caracterizada por redução no número de dedos, desaparecendo o segundo e o quarto metacarpianos/metatarsianos, ocorrendo o crescimento e adaptação do terceiro metacarpo/metatarso (5,3 milhões de anos atrás), o que colocou o apoio do corpo sobre as pontas dos dedos. Os cavalos aumentaram de peso e tamanho, mas conservaram em geral sua aptidão para o deslocamento rápido. O cavalo foi empregado em diversos trabalhos, nas mais variadas condições, às vezes, muito duras. Tiveram seus hábitos modificados, onde a alimentação deixou de ser somente pasto, passando a alimentação baseada em concentrado, permanecendo a maior parte do tempo confinados em baias (JONES, 1987).

A capacidade dos eqüinos em se locomover depende da integridade do sistema microvascular localizado profundamente dentro do “corium” do casco. Esta sofisticada rede vascular fornece nutrientes e drena resíduos metabólicos da interface entre as lâminas epidérmicas e dérmicas. O complexo sistema interdigital de lâminas primárias e secundárias fornece forte ligação entre a parede da muralha e o tecido conectivo laminar. A ligação da falange distal ao “corium” mantém o osso no seu alinhamento

anatômico normal. Calcula-se que a área de superfície de apoio de cada aparato suspensor laminar seja em média de $1,3 \text{ m}^2$, aproximadamente a extensão da pele de um ser humano adulto de baixa estatura (POLLITT & DARADKA, 1998). Esta grande área superficial de sustentação da falange distal, e a extensa complacência da arquitetura lamelar interdigital, ajudam na redução da tensão e garantem o equilíbrio na transferência de energia durante o pico de carga do casco do eqüino. Durante o pico de carga, a muralha do casco e a falange distal movem-se em conjunto e separam-se quando a laminite interfere na anatomia laminar (POLLITT, 2001).

O dígito eqüino consiste no casco epidérmico e tudo o que ele envolve: o “corium” de tecido conjuntivo (derme), o coxim digital, a maior parte das cartilagens laterais (colaterais) da falange distal, a articulação interfalângica distal, a extremidade distal da falange média e o osso sesamóide distal (osso navicular), vários ligamentos, tendões de inserção dos músculos: extensor digital comum longo e flexor digital profundo, vasos sanguíneos e nervos. A junção preliminar do dígito é a interfalângica distal compreendida pela falange medial, a falange distal e o osso sesamóide distal (KAINER, 1989).

A fonte arterial da extremidade distal do membro torácico é derivada principalmente das artérias palmares digitais medial e lateral. O primeiro ramo ao nível da junção interfalângica proximal é a artéria bulbar, que além de fornecer ramos para o coxim digital também emite ramificações como as artérias coronárias, que irrigam os talões e o “corium” perióplico. O ramo seguinte é o da artéria dorsal da falange medial, que dá origem a anastomoses dorsalmente formando o círculo coronário arterial. A artéria coronária e o círculo coronário arterial fornecem ramos para a articulação interfalângica distal, tendão do músculo extensor digital comum longo, “coriuns” perióplico e coronário, fáscia e pele. O arco colateral na falange média é formado pelos ramos da artéria digital palmar e artéria palmar da falange média. Este arco irriga o osso sesamóide distal, a junção interfalângica distal, o coxim digital e o “corium” ungueal. Na falange distal, a artéria palmar dorsal dá origem à artéria palmar da falange distal, que irriga o coxim digital e o “corium” da ranilha, essas artérias desprendem ramos que originam a artéria circunflexa e o arco terminal, irrigando o osso sesamóide

distal, “corium” laminar, e os “coriuns” solares e ungueais (KAINER, 1989). O fluxo de sangue dentro das lâminas é de distal para proximal. Anastomoses arteriovenosas ocorrem na derme, faixa coronária, nas estruturas neurovasculares dentro das lâminas dérmicas, e na entrada e ao longo do comprimento das lâminas dérmicas (POLLITT & MOLYNEUX, 1990; MOLYNEUX et al., 1994).

Pesquisadores relataram que a densidade de anastomoses arteriovenosas no interior das lâminas é alta, cerca de 500 unidades/cm², existindo diversas hipóteses para o funcionamento dessas anastomoses. Uma das hipóteses é que durante longos períodos de exposição ao frio, ocorre a abertura das anastomoses para permitir o aquecimento dos cascos pelo aumento do fluxo de sangue. A outra hipótese é que as flutuações da pressão alta (aumentos da pressão no dígito devido ao galope e ao salto) fazem com que ocorra à abertura das anastomoses para dissipar a elevação na pressão, agindo como “válvula de segurança” para o sistema vascular (POLLITT & MOLYNEUX, 1990).

As estruturas profundas do casco e do osso sesamóide distal são drenadas por três plexos venosos: plexo dorsal no “corium” laminar, plexo coronário no “corium” coronário e plexo palmar. Na borda proximal de cada cartilagem, os três plexos convergem para veia digital palmar. Localizadas na superfície palmar média da falange média, as anastomoses entre as veias digitais palmar, drenam o osso sesamóide distal e o coxim digital. A maioria das veias do casco tem válvulas e o sentido de seu fluxo é dependente da direção das forças e do peso (KAINER, 1989). Devido, provavelmente, à anatomia do membro distal e às forças requeridas para o retorno venoso ao coração, os vasos digitais são completamente musculares quando comparados com as veias de outros tecidos e de outras espécies (ALLEN et al., 1988a).

Os nervos do casco derivam principalmente dos nervos palmar digital medial e lateral. Um ramo dorsal, e em aproximadamente 30% dos cavalos, um ramo intermediário, fornecem inervação vasomotora e sensorial ao aspecto dorsal da articulação interfalângica distal, ao “corium” perióplico e ao “corium” laminar (KAINER, 1989). O nervo digital palmar continua em direção distal suprindo o “corium” solar e laminar (MOLYNEUX et al., 1994).

Em estudos sobre a anatomia e microscopia ótica de casco de eqüinos normais, STUMP (1967) observou que o casco renova-se constantemente e comparou este mecanismo ao que ocorre na pele. Histologicamente a epiderme do casco é caracterizada por uma fina camada interna, o estrato germinativo próximo ao “corium” e uma camada pesada de estrato córneo. O estrato germinativo forma uma camada continua sobre o “corium”, e as várias partes de crescimento do casco resultam da proliferação desta camada (STUMP, 1967).

O casco é composto pelo estrato externo, uma delgada camada córnea tubular, macia e escamosa, que se origina das camadas germinativas da epiderme do períoplo. O estrato médio, consistente de queratina tubular e intertubular, constitui a principal estrutura de sustentação da parede (HOOD, 1999; STUMP, 1967). Os túbulos córneos estão orientados paralelamente à superfície externa do casco e suas células queratinizadas possuem disposição altamente ordenada. O estrato interno é formado por aproximadamente 600 lâminas queratinizadas primárias, orientadas verticalmente e que se estendem para o interior do estrato médio, com o qual são contínuas. Cerca de 100 a 200 lâminas secundárias projetam-se em ângulos retos de cada lâmina primária (Figura 1). Essas lâminas se interdigitam com lâminas semelhantes do “corium” e ancoram o casco queratinizado no tecido conjuntivo sensível adjacente (STUMP, 1967).

Do ponto de vista fisiológico, é mais correto entender que o tecido córneo do casco, em suas diversas localizações, varia em propriedades histoquímicas e deve ser tanto duro como macio em diferentes regiões anatômicas, para realizar diversas funções. Normalmente, a dureza do tecido córneo da cápsula é descrito em ordem decrescente no sentido muralha>sola>talão >linha branca.

A epiderme lamelar é uma espécie de “forro viloso” da muralha do casco. Essas vilosidades aumentam muito seu adelgaçamento nas porções mais distais e permeiam o tecido córneo da sola para formar a linha branca. As lâminas são estruturas folhosas dispostas perpendicularmente na superfície interna da muralha (Figura 1). Elas aumentam a superfície interna da muralha para fornecer o máximo de sítios para ligação das estruturas fibrosas da falange distal (STUMP, 1967).

Em cada estrutura, o tecido córneo é produzido pelos queratinócitos da epiderme em processo especializado conhecido como queratinização. As células epidérmicas se tornam queratinizadas, em processo descrito como “morte programada” (Figura 1). A estrutura e a qualidade do tecido córneo são dependentes da queratinização fisiológica, na qual o produto final, o tecido córneo do casco, pode não ser de boa qualidade. Devido à epiderme ser avascular, os queratinócitos dependem, para sua nutrição da difusão de oxigênio e nutrientes da fina microvasculatura da derme (“corium”), passando através da membrana basal. Essa difusão é facilmente quebrada, ocorrendo, neste caso como resultado, a produção de tecido córneo com alterações estruturais. O tecido córneo consiste de células epidérmicas queratinizadas e uma substância de ligamento conhecida como material de cobertura de membrana, uma espécie de cimento. Os queratinócitos da camada basal da epiderme produzem dois tipos de queratinas protéicas: proteínas filamentosas e proteínas de filamento associadas. As últimas são caracterizadas por seu alto conteúdo de cisteína. A estabilidade estrutural do tecido córneo é resultado do complexo queratina-proteína feito possivelmente pelas ligações dissulfetos entre os resíduos de cisteína. O material de cobertura de membrana é produzido pelos queratinócitos da camada espinhal da epiderme. Este material consiste de glicoproteínas e lipídios complexos e pode ser considerado uma “argamassa”. As porções glicoprotéicas do material de cobertura de membrana são necessárias para a ligação das células do tecido córneo, e os lipídios são componentes importantes como barreiras de permeabilidade necessária para manter hidratação do tecido córneo nas condições ambientais às quais estão expostos (COFFMAN et al., 1970).

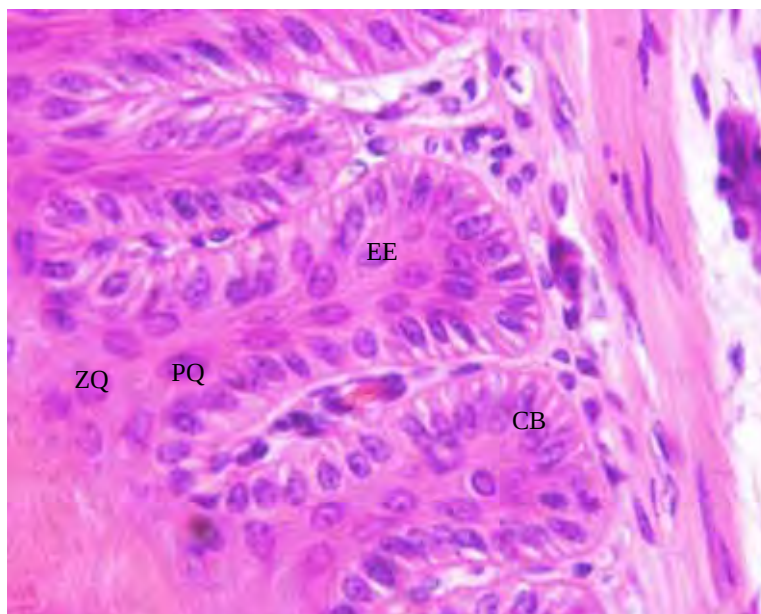


Figura 1 – Ilustração da composição das lâminas epidérmicas secundárias do casco de eqüinos normais, mostrando o estrato espinhoso (EE), precursores de queratinócitos (PQ), zona queratogénica (ZQ) e célula basal (CB) (HE – Aumento de 100x).

1.1. Forças transferidas através ao casco

Um cavalo normal carrega aproximadamente 22% de seu peso em cada membro pélvico e 28% sobre cada membro torácico. Existem cinco cargas preliminares colocadas no dígito de um eqüino em estação: (1) cargas compressivas devido ao peso do cavalo; (2) força tênsil de tração do tendão flexor digital profundo; (3) força tênsil de tração interdigital laminar da parede casco; (4) força tênsil de tração do tendão extensor digital comum longo; e (5) força compressiva da sola no chão. As três forças predominantes em ordem ascendente de importância são a carga compressiva exercida pela massa do corpo, a força tênsil produzida pela tração do tendão flexor digital profundo sobre a falange distal e a força tênsil da interface laminar (GARNER et al., 1975b).

1.2. Fisiologia vascular digital normal

As veias digitais são altamente musculares, têm parede vascular relativamente inelástica, e estão situadas em compartimento não complacente, (ALLEN et al., 1988a). As artérias digitais e veias eqüinas são altamente sensíveis às substâncias vasoconstrictivas, especialmente norepinefrina e endotelina (BAXTER et al. 1989a). Além disso, “in vitro”, as veias digitais são mais sensíveis do que as artérias ao efeito da angiotensina, tromboxane, norepinefrina e serotonina, além de outras substâncias endoteliais vasoconstrictivas (BAXTER et al., 1989a). Em estudos “in vitro” da vasodilatação das veias e artérias digitais, foi observado que as veias dilatam mais do que as artérias em resposta a acepromazina e isoxsuprina (BAXTER et al, 1989b).

A administração de acetilcolina, prostaglandina E_2 e prostaglandina I_2 (prostaciclina) resultou em vasodilatação através das ações endotelio-dependentes do óxido nítrico e a dilatação através deste mecanismo foi abolida pela incubação de tecidos com a N^G -nitro-L-arginina ester metil (L-NAME), uma substância inibidora da óxido nítrico sintetase. Ao avaliar a ação vasoconstritora da 5-Hidroxitriptamina (5-HT), BAILEY & ELLIOTT (1998) observaram que esta era mais potente nas artérias digitais do que nas artérias faciais e caudais. A baixa complacência e alta sensibilidade às substâncias venoconstrictivas predispõe o dígito eqüino à pressão venosa elevada e pressão hidrostática crescente, aumentando assim, segundo estes autores, a probabilidade de formação de edema laminar.

No tecido normal, os três fatores de segurança principais que neutralizam a formação do edema são: permeabilidade capilar, resistência pré e pós-capilar e drenagem linfática. A impermeabilidade do endotélio capilar serve como barreira à transudação de líquido e proteína. Isto resulta em um gradiente mais elevado entre o capilar e a pressão oncótica do tecido, favorecendo o movimento de líquido no lúmen capilar. Avaliado pelo uso da bomba de perfusão extracorporal digital preparada para medir às forças de Starling dentro do dígito eqüino, o leito capilar digital do eqüino

normal é altamente permeável ao líquido e macromoléculas. O leito capilar retém somente 67% das macromoléculas e é mais permeável do que o leito vascular da pata do cão e do rato (ALLEN et al., 1988b). Esta característica resulta em maior concentração da proteína intersticial, favorecendo a formação do edema. Uma resistência pós-capilar baixa e pré-capilar elevada (8% e 92%, respectivamente) reduz à pressão capilar, diminuindo desse modo a pressão hidrostática de filtração do líquido trans-capilar. A relação de resistência pré para pós-capilar em cavalos saudáveis é comparável com o leito capilar músculo-esquelético de outras espécies (ALLEN et al., 1988b). O terceiro fator de segurança do edema é fornecido pela drenagem linfática. Os vasos linfáticos do dígito são poucos e de diâmetro pequeno; conseqüentemente, é improvável que a circulação linfática possa proteger eficazmente o casco do edema enquanto as forças hidrostáticas favorecem sua formação (ALLEN et al., 1990).

1.2.1. Controle do tônus do músculo liso vascular

O músculo liso apresenta grande quantidade de filamentos de actina, intercaladas com poucos filamentos de miosina (filamentos protéicos). Devido ao menor número de filamentos protéicos, a força de contração é bem menor do que a das fibras estriadas. As contrações são também bem mais lentas e com tempo mais prolongado, pois na maioria das fibras lisas não existem retículos sarcoplasmáticos e, quando presentes, estes são pequenos e rudimentares. A maioria dos íons cálcio necessários para desencadear o processo contrátil entra nas fibras através de sua membrana, provenientes do líquido extra-celular. Tanto a entrada do cálcio (por difusão simples) quanto à saída de cálcio (por transporte ativo) são lentas. Assim, as células do músculo liso vascular sofrem contração quando aumenta a concentração intracelular do ion cálcio $[Ca^{2+}]$, todavia, o acoplamento do Ca^{2+} e sua concentração é menos rigoroso do que no músculo estriado ou no músculo cardíaco. Os vasoconstritores e os

vasodilatadores atuam ao aumentar ou reduzir o Ca^{2+} e/ou alterar a sensibilidade da estrutura contrátil o Ca^{2+} (FARACI et al., 1998).

1.2.2 Mecanismo de Contração

O Ca^{2+} intracelular no músculo liso vascular encontra-se principalmente no retículo sarcoplasmático, principal local de armazenamento do Ca^{2+} a ser liberado, e nas mitocôndrias.

Muitos vasoconstritores ativam a fosforilase C (enzima ligada à membrana), aumentando o trifosfato de inositol (IP_3). O inositol ativa receptores do retículo sarcoplasmático, liberando Ca^{2+} no citoplasma. No músculo liso o complexo Ca^{2+} -calmodulina regula a quinase de miosina MLCK, que fosforila as cadeias livres da miosina, permitindo a interação da miosina + actina iniciando assim o processo de contração (FARACI et al., 1998).

1.2.3 Mecanismo de Relaxamento

A abertura dos canais de potássio presentes na membrana das células musculares vasculares provoca aumento da saída de íons do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva, o que causa hiperpolarização da membrana celular. Este estado de hiperpolarização conduz ao encerramento de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem e conseqüente diminuição na $[\text{Ca}^{2+}]$ no interior da célula, causando o relaxamento vascular (vasodilatação). Os canais de potássio (K^+) sensíveis ao ATP intracelular são abertos por drogas, como o diazóxido, provocando hiperpolarização e, assim, impedindo a abertura dos canais de Ca^{2+} ; receptores acoplados à adenilato ciclase aumentam a produção de AMPc. Este atua inibindo a contração; e a estimulação da guanilato ciclase solúvel pelo NO (fator de relaxamento

derivado do endotélio) aumenta a formação de GMPc, é este que relaxa o músculo liso vascular (FARACI et al., 1998).

II. INTRODUÇÃO A LAMINITE

A laminite eqüina vem ao longo dos anos sendo o foco de interesse clínico e científico. O registro mais antigo referente à laminite data de 350 AC, quando foi referido como “a doença da cevada” por Aristóteles (WAGNER & HEYMERING, 1999). Durante o século IV, o grego Apsyrus escreveu o livro Hippiatrica (Medicina Eqüina) por ordem do Imperador Constantino, no qual descreveu o tratamento da Doença da Cevada onde era realizada uma sangria suave, exercício leve e dieta limitada. Desde esse tempo, vários nomes e etiologias foram ligados a laminite. O termo “FOUNDER” foi derivado durante o ano de 1500 da palavra “MORFOUNDE”, usada por marinheiros para descrever os navios engolidos por uma sucessão das ondas, em associação com o afundar da falange distal na cápsula do casco (DUNLOP & WILLIAMS, 1996). O termo “laminite” foi utilizado por volta do ano de 1700 indicando inflamação das lâminas do casco (SMITH, 1919).

A laminite é uma doença extremamente dolorosa, associada à debilitação severa do organismo. Os fatores predisponentes responsáveis pelo desenvolvimento da laminite são múltiplos e variados, incluindo superalimentação (grãos e pastos verdes e viçosos, ricos em carboidratos), ingestão de água fria, trauma, infecções sistêmicas e administração de alguns glicocorticosteróides (Dexametazona e Triancinolona). A excessiva sustentação do peso no membro de apoio durante a grave claudicação do membro contralateral pode produzir laminite, da mesma forma que o trabalho pesado em piso duro ou a extrema exaustão e desidratação (MOORE et al., 1989). POLLITT (1999) relatou que aberrações multissistêmicas em órgãos anatomicamente distantes dos cascos resultariam na exposição do tecido lamelar, a fatores que levariam a sua separação e desorganização anatômica e estrutural. A natureza exata do fator gatilho

da laminite, que aparentemente influencia o tecido lamelar via circulação, está ainda para ser elucidado.

HOOD (1980) relatou que antes da discussão dos dados, existem os conceitos gerais que devem ser analisados. O primeiro deste é que a laminite é uma síndrome sistêmica envolvendo vários órgãos. Segundo, supõe-se que, embora os fatores etiológicos ou predisponentes da laminite sejam variados, há um único caminho ou mecanismo comum que resulte na claudicação. Terceiro, a elucidação do mecanismo fisiopatológico da laminite é a chave do desenvolvimento de medicamentos de prevenção e tratamento seguros.

Estudos angiográficos, realizados para examinar o diâmetro e a distribuição do suprimento vascular dentro do casco, foram realizados por COFFMAN et al. (1970) e ROBINSON et al. (1976) em eqüinos normais e com laminite aguda. Estes estudos revelaram aumento no diâmetro dos grandes vasos e diminuição no diâmetro dos vasos terminais do casco durante a fase aguda, consistentes com a ocorrência de vasoconstrição.

O uso de moléculas radioativas de albumina, para avaliar a distribuição funcional do fluxo digital capilar à presença de desvios arteriovenosos significantes foi estudado e as imagens obtidas revelaram diminuição na perfusão em todos os cavalos com laminite aguda. A diminuição na perfusão foi proporcional à severidade da claudicação clínica e foi invertida naqueles cavalos que se recuperaram. Neste trabalho, os autores demonstraram que a redução na perfusão capilar na região laminar ocorria devido à abertura das anastomoses arteriovenosas, na altura do plexo coronário, durante o início da claudicação (HOOD et al., 1978).

Em estudos foi verificado que nem todos os cavalos desenvolvem hipertensão sistêmica. O desenvolvimento da hipertensão coincide com ou ocorre após o início da claudicação. O sucesso do tratamento da hipertensão depende do início do tratamento. Se a hipertensão for tratada com analgésicos sistêmicos, bloqueio anestésico local do casco ou bloqueio α e β -adrenérgicos durante as primeiras 12 horas após a claudicação, a pressão arterial pode ser reduzida ao limite normal. Estes dados suportam a hipótese que a hipertensão é secundária a dor causada nos cascos e está

mediada inicialmente pelo sistema nervoso simpático, que pode representar ou não um mecanismo possível de feedback positivo (Figura 2) em que os cascos se tornam progressivamente mais isquêmicos devido a vasoconstrição das vasos digitais (HOOD, 1980).

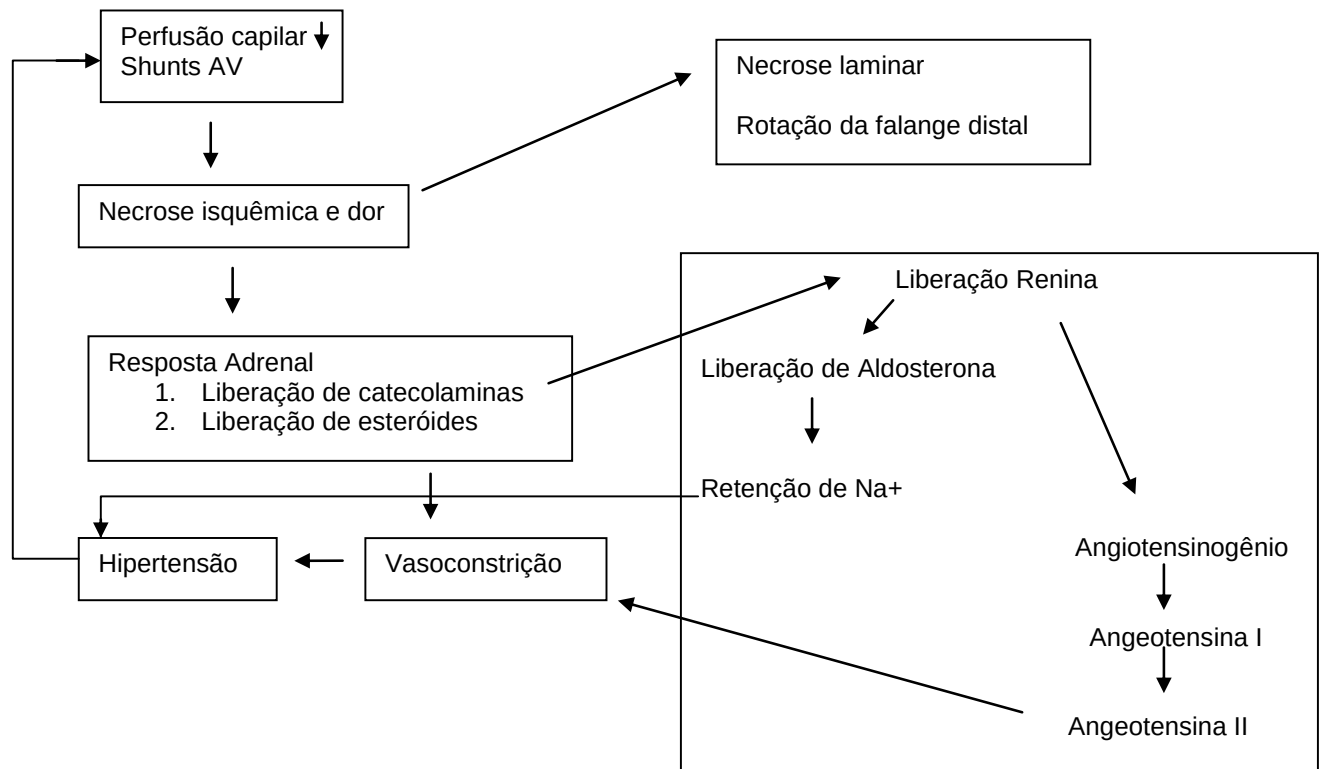


Figura 2 - A hipótese do ciclo de feedback positivo proposto como um componente da fase aguda da síndrome da laminite (HOOD, 1980).

2.1. Estágios da Laminite

Com a utilização de um modelo de sobrecarga de carboidratos para induzir a laminite, foram identificadas as seguintes fases: de desenvolvimento ou prodrômica, aguda, subaguda e crônica.

Fase de desenvolvimento ou prodrômica: inicia-se pela ação dos mediadores e outros fatores que desencadeiam o ciclo etiopatogênico até que os animais apresentem os primeiros sinais de claudicação, a manifestação é sub-clínica e pode durar entre 4 a 6 horas do início da ação do agente etiológico (HOOD et al., 1993). Estudos sobre a patogênese e terapêuticos para a prevenção desta doença são melhores focalizados durante este estágio.

Fase aguda: inicia-se desde o momento em que o animal apresenta os primeiros sinais de claudicação até que ocorra o afundamento ou rotação da falange distal.

Fase subaguda: o cavalo mantém os sinais clínicos por 72 horas, porém não há falha estrutural no casco.

Fase crônica: inicia-se com o afundamento ou rotação da falange distal, ou deve ser considerada quando o quadro de dor intensa perdurar mais de 48 horas de forma contínua. Nessa fase a claudicação é intermitente dando a impressão clínica de agudização do processo (HOOD, 1999).

2.2 Sinais clínicos

A laminite é uma doença que pode insidir nos quatro cascos; entretanto, afeta geralmente os membros torácicos, por suportarem aproximadamente 60% da massa corpórea (HOOD, 1999). O aumento de carga nos membros torácicos comparado com a dos membros pélvicos, é uma justificativa para esclarecer a ocorrência maior da laminite nos torácicos. Para definir melhor a severidade dos sinais clínicos exibidos pelos cavalos, OBEL (1948) elaborou um sistema que classifica a claudicação causada pela laminite em graus, conhecido como graus de Obel. As graduações de claudicação associadas à laminite são as seguintes: Grau I, o cavalo levanta incessantemente os membros, com intervalo de poucos segundos; Grau II, o animal se move voluntariamente ao passo, porém sua marcha é característica de laminite. Permitindo ainda neste estágio que se erga um dos seus membros torácicos sem que isto dificulte

a sua posição em estação; Grau III, o cavalo resiste vigorosamente a que lhe eleve algum de seus cascos e está relutante em mover-se; Grau IV, para movimentar-se o cavalo deve ser forçado e só o faz com extrema dificuldade, permanecendo a maior parte do tempo deitado.

Existem outros sinais clínicos característicos da laminite como o aumento da temperatura sobre a superfície dorsal da parede do casco, pulso digital aumentado (aumento na diferença entre a pressão arterial digital sistólica e diastólica), teste de sensibilidade dos cascos, edema da faixa coronária, e contínua alteração de distribuição de peso nos membros. Sinais mais severos como depressão na faixa coronária ou perfuração de sola são indicações de rotação ou afundamento da falange distal (HOOD, 1999).

2.3 Modelos de indução da laminite aguda

2.3.1 Modelo da sobrecarga de carboidratos (CHO)

Utilizada pela primeira vez por OBEL (1948), que reproduziu a doença ao fornecer aos eqüinos uma papa de amido de milho, e estipulou a claudicação causada pela laminite em graus. Este modelo experimental vem sendo utilizado até os dias de hoje, por ser um método consistente e clinicamente relevante para a indução da laminite aguda em cavalos. Esta metodologia foi preciso para avaliar perfeitamente os mecanismos na patogênese e para desenvolver prevenções e potenciais terapêuticos no controle da doença. Os mecanismos que ligam a administração de CHO ao desenvolvimento da laminite aguda não estão ainda totalmente esclarecidos embora já tenha sido reunida muita informação. Alterações na flora cecal, acidose láctica e a endotoxemia foram associadas com a administração de CHO, porém a estimulação direta das alterações sistêmicas e digitais que ocorrem precisam ainda ser

determinadas (GARNER et al., 1978, MOORE et al., 1979, SPROUSE et al., 1987, WEISS et al., 2000). Os cavalos desenvolvem sinais clínicos de laminite progredindo ao grau 3 de Obel aproximadamente 40 horas após administração de CHO. Os cavalos induzidos apresentaram alterações locomotoras similares às dos eqüinos que desenvolveram laminite naturalmente adquirida assim como frequência cardíaca e temperatura retal aumentadas, leucocitose e hiperproteinemia (COFFMAN et al., 1972, GARNER et al., 1975a, MOORE et al., 1981).

As alterações que precedem o desenvolvimento dos sinais clínicos usando o modelo de CHO são: hipotensão arterial e venosa inicial, seguidas de hipertensão arterial, associada ao aumento do volume globular médio, leucocitose e hiperproteinemia (GARNER et al., 1975a). Notou-se também que os membros dos cavalos estavam frios, 24 horas, após administração do CHO, porém a coroa do casco estava morna ao toque. As alterações hemodinâmicas sistêmicas marcantes incluíram declínio nas pressões atrial direita, arterial diastólica sistêmica e a arterial sistólica sistêmica, que alcançaram valores máximos aproximadamente 16 horas após a administração de CHO (GARNER et al., 1975b). Esta queda de pressão foi seguida por aumento constante na pressão atrial direita, pressão arterial diastólica e na pressão arterial sistólica. Estes resultados sugerem que as alterações no sistema cardiovascular e na vasculatura digital local ocorrem em cavalos com laminite e estão possivelmente, associadas ao aumento na liberação ou ativação de mediadores vasoativos.

Em estudos subseqüentes usando a perfusão digital isolada, observou-se que forças hemodinâmicas específicas atuam na microcirculação laminar em cavalos com laminite induzida experimentalmente (ROBINSON et al., 1976, ALLEN et al., 1990, EATON et al., 1995). O distúrbio no fluxo sangüíneo digital que ocorre durante o início da síndrome causada pela sobrecarga de CHO no trato gastrintestinal foi hipotetizada como a causa predominante da laminite (GARNER, 1975a).

Pesquisadores mensuraram as forças de Starling e relataram que ocorre aumento na resistência venosa (ALLEN et al., 1990, EATON et al., 1995). Esses pesquisadores perceberam diferenças entre as resistências vasculares dos segmentos pré e pós-capilar, sugerido a ocorrência de aumento na resistência vascular no lado

venoso do leito capilar laminar no estágio prodrômico da laminite, fornecendo suporte à hipótese que o aumento do tônus venomotor inicia a laminite. A venoconstrição aumentada resulta em aumento da resistência vascular e pressão hidrostática capilar. Este desequilíbrio aumenta a força hidrostática no capilar promovendo o fluxo de líquidos através do leito capilar dentro do casco, resultando em edema laminar quando a permeabilidade capilar volta ao normal (ROBINSON et al., 1976, ALLEN et al., 1990, EATON, 1995). O aumento na pressão intersticial laminar, devido à formação do edema, excede a pressão de fechamento crítico dos capilares digitais uma vez que estes estão situados entre a cápsula rígida do casco e a superfície óssea da falange distal, induzindo desse modo a “síndrome compartimental” (ALLEN et al., 1990). Quando o aumento da pressão tecidual está acima da pressão crítica de fechamento capilar, ocorre colapso dos capilares, conduzindo a isquemia tecidual. O uso de venogramas demonstrou redução na perfusão vascular terminal do casco após a indução da laminite com sobrecarga de carboidrato (ACKERMAN et al., 1975, RUCKER et al., 2006). Pesquisadores correlacionaram que o fluxo sangüíneo reduzido é favorecido pela formação das anastomoses arteriovenosas na banda coronária (ALLEN et al., 1990, HUNT, 1991).

HOOD et al. (2001) utilizando o modelo de sobrecarga de CHO observaram diminuições na temperatura superficial da muralha do casco oito a 12 horas antes do início da claudicação. Os autores concluíram que estes achados indicavam redução de perfusão laminar e atividade metabólica. Em estudos recentes, POLLITT & DAVIES (1998) contestaram essas teorias ao afirmarem que na fase prodrômica da laminite ocorre vasodilatação e não vasoconstrição. Esses autores constataram aumentos na temperatura do casco na fase de desenvolvimento da lesão, correlacionando esses achados com a ocorrência de vasodilatação do dígito. ROBINSON (1990), TROUT et al. (1990) também afirmaram que a laminite é precedida por aumento do fluxo de sangue na região laminar.

Embora numerosos mediadores sejam prováveis contribuintes da alteração vascular mencionada previamente, os mediadores principais ainda precisam ser determinados. Foi recentemente demonstrado que a expressão de ET-1 nos tecidos

conectivos lamelares obtidos de cavalos com laminite aguda induzida com CHO e de cavalos com laminite crônica naturalmente adquirida estava aumentada quando comparado com o grupo controle (KATWA et al., 1999).

Alguns autores consideram a ocorrência de trombose e conseqüente diminuição da perfusão um evento inicial na patogênese da laminite induzida pela ingestão de grandes quantidades de carboidratos (WEISS et al., 1994; WEISS et al., 1995). Embora a contagem de plaquetas permaneça constante, esses autores demonstraram diminuição no tempo de sobrevivência plaquetária oito horas após administração de carboidratos (MOORE et al., 1981), correlacionando estes achados a formação de microtrombos dentro das vênulas da derme lamelar (WEISS et al., 1997).

Estudos histológicos das alterações lamelares durante a laminite foram executados 48 a 96 horas após indução da laminite com o modelo de sobrecarga de CHO. MOSTAFA (1986) focalizou seus estudos morfológicos associados à laminite nas modificações ocorridas após observação de claudicação, estendendo-se desde a sua ocorrência até 72 horas após. Algumas observações descrevem alterações presentes antes ou coincidentes com o início da claudicação. Neste momento, as alterações histológicas surgem nos vasos da circulação digital. Apenas quatro horas depois do aparecimento da claudicação, observa-se inchaço das células endoteliais e edema (MOSTAFA, 1986, HOOD et al., 1993). Congestão e obstrução eritrocítica dos capilares laminares estão presentes no período de oito horas. Infiltrado perivascular aparece entre seis e doze horas e então diminui à medida que os leucócitos migram para as camadas epidermais. Células do endotélio arteriolar estão deformadas pelos processos citoplasmáticos estendendo-se para a superfície luminal. Trombos microvasculares e edema severo aparecem em 24 horas e ocorre hemorragia na lâmina dérmica primária em 72 horas (MOSTAFA, 1986). Essas alterações não são consideradas vasculites, uma vez que não ocorre infiltração persistente de células inflamatórias na parede dos vasos (REED, 1977). Segundo BURCH et al., (1979), as alterações vasculares assemelham-se a vasoconstrição observada no choque hemorrágico e na doença vasoespástica humana. As pontes endoteliais presentes na laminite aguda são semelhantes as que se desenvolvem pelo contato entre células após vasoconstrição

intensa (JORIS & MAJNO, 1981). Distorções anatômicas das lâminas ocorrem apenas oito horas após a claudicação. Há adelgaçamento e afunilamento das estruturas lamelares acompanhadas por redução, achatamento e deslocamento das camadas epiteliais (OBEL, 1948; MOSTAFA, 1986; POLLITT, 1996).

As alterações na função endotelial da célula devido à laminite aguda podem afetar ações endotélio-dependentes alterando a resposta vascular digital a agentes vasoativos. Estudos indicam que os vasos digitais de eqüinos normais têm capacidade substancial para o relaxamento endotélio-dependente pelo óxido nítrico “in vitro”, esclarecendo aproximadamente 70% a 85% do relaxamento máximo induzido por acetilcolina (BAXTER et al., 1989b). Em cavalos com laminite induzida com sobrecarga de CHO, o relaxamento mediado pela acetilcolina foi reduzido em vasos digitais “in vitro”, causando vasoconstrição, sugerindo que a capacidade de produção do óxido nítrico pelo endotélio vascular danificado estava reduzida, com isto os vasos tornam-se mais sensíveis ou vulneráveis a agentes vasoconstritores (SCHNEIDER et al., 1999). Segundo BRYANT & ELLIOT (1994), a utilização de precursores de óxido nítrico, denominados nitrovasodilatadores, apresentou resultados clínicos promissores quando utilizados em cavalos com laminite.

2.3.2 Modelo do extrato da noqueira preta

Descrito primeiramente por MINNICK et al. (1987) como um modelo melhorado da sobrecarga de CHO para a indução da laminite aguda. Este procedimento ficou conhecido após cavalos ficarem expostos à serragem fresca da noqueira preta, uma árvore do gênero *Juglans* e desenvolverem laminite aguda, atraindo o interesse de pesquisadores de investigar se o extrato fornecido via sonda nasogástrica induziria consistentemente a laminite aguda e qual seria o agente causador da laminite. Foram fornecidos aos eqüinos 2g/kg de peso vivo de uma efusão escura, a qual foi fornecida por meio de sonda nasogástrica. Neste caso o fator responsável pelo desenvolvimento

da laminite, ainda desconhecido, estaria associado à formação de edema. Oito dos 10 eqüinos induzidos desenvolveram sinais clínicos de laminite no período de 12 horas da administração do extrato da noqueira preta. As análises hematológicas revelaram diminuição inicial na contagem das células brancas do sangue com diminuição de 30% nos valores basais quatro horas após a indução pelo extrato, seguidos de aumento na contagem das células brancas do sangue acima dos valores basais oito horas após a indução. Adicionalmente também se observou aumento do volume globular, e hiperglicemia (GALEY et al., 1991). As alterações na contagem das células brancas foram similares àquelas observadas após a administração da sobrecarga de CHO (GARNER et al., 1975a). GALEY et al. (1991) sugeriram que essas alterações nas células brancas do sangue são características de cavalos com endotoxemia, porém EATON et al (1995) examinando as concentrações sangüíneas de endotoxinas, três horas após indução com extrato da noqueira preta, não detectaram endotoxinas nas amostras. A diminuição na pressão venosa central e na pressão arterial sistêmica utilizando o modelo de indução pelo extrato da noqueira preta não se alteraram tanto quanto as respostas induzidas pelo modelo de sobrecarga de CHO (EATON et al., 1995). O modelo do extrato da noqueira preta foi considerado melhor por não estar associado com os sinais de endotoxemia e diarreia e o tempo de desenvolvimento dos sinais associados com a laminite aguda são menores em comparação com o modelo de indução com CHO (EATON et al., 1995, GALEY et al., 1991).

EATON et al (1995) utilizaram o modelo do extrato da noqueira preta para avaliar a ação das forças de Starling sobre os cascos, observando que duas a quatro horas após a administração do extrato ocorriam aumento na resistência venosa pós-capilar. O aumento na resistência venosa e na pressão hidrostática capilar, ocorrido neste modelo de indução foi semelhante ao modelo de sobrecarga com CHO (ALLEN et al., 1990). Em estudos prévios usando o modelo do extrato da noqueira preta para avaliação da força de Starling, foi observado que não há alteração na resistência pré-capilar quando comparada com os cavalos saudáveis, diferentemente do que ocorreu no modelo de sobrecarga com CHO, onde a resistência pré-capilar também estava aumentada (ALLEN et al., 1990). As diferenças entre estes dois modelos podem ser devido às

diferenças no sincronismo de eventos no desenvolvimento da laminite. A severidade da venoconstricção na laminite induzida com extrato da noqueira preta foi menor do que aquela associada com a sobrecarga de CHO. Isto pode ocorrer devido a uma diferença na fisiopatologia da doença ou mais provável porque a força de Starling foi avaliada em estágios diferentes (2 a 4 horas contra 16 horas) da doença.

GALEY et al. (1990) utilizaram a gama cintigrafia ^{99m}Tc por meio de marcadores moleculares de albumina infundidos regionalmente nos membros torácicos 12 horas após a administração do extrato da noqueira preta. A utilização da técnica permitiu aos autores observar que a perfusão digital estava diminuída, principalmente na derme coronária e lâmina dorsal. Este modelo de indução foi semelhante ao modelo de sobrecarga de CHO, demonstrando forte evidência da ocorrência de um evento isquêmico no dígito durante as fases adiantadas do desenvolvimento da laminite.

FONTAINE et al. (2001) examinaram a expressão da interleucina-1 beta nas lâminas de eqüinos e observaram aumento na expressão desta substância, evidenciando a existência de resposta inflamatória no início da fase de desenvolvimento da doença induzida com o extrato da noqueira preta. GALEY et al. (1991) relataram aumento na expressão de citocinas inflamatórias, tais como interleucina-1 beta, as quais alteram sistemas múltiplos incluindo a liberação de substâncias vasoativas, pró-coagulantes, e outros mediadores pró-inflamatórios. A liberação destas substâncias pode alterar variáveis hemodinâmicas e hematológicas observadas no desenvolvimento da doença.

Os estudos morfológicos, dos cascos dos eqüinos, 12 horas após a indução com o extrato da noqueira preta revelaram suave vacuolização das lâminas dérmicas secundárias. Ocorreu congestão vascular suave. No ápice das lâminas epidérmicas primárias havia ausência de células basais e, em algumas áreas ocorria necrose. Em outro estudo estes mesmos autores analisaram amostras de cascos eqüinos após 84 horas da indução com o extrato da noqueira preta, relatando alterações severas, incluindo perda da arquitetura normal do tecido e a presença de restos celulares. Regenerações celulares epiteliais foram encontradas em áreas de necrose as quais estavam marcadas por um número elevado de figuras mitóticas (GALEY et al., 1991).

2.3.4 Modelo da Frutana (Oligofrutose – OF)

O modelo de indução da laminite com sobrecarga de CHO é associado com alta morbidade. Não obstante, este modelo transformou-se em padrão para os estudos da laminite, parcialmente devido a sua similaridade com o protocolo da sobrecarga de grãos, causa comum de casos naturais da laminite. Em um esforço para reter os laços clínicos do modelo, mas diminuir a morbidade, POLLITT & VAN EPS (2002) desenvolveram o modelo da Frutana para indução da laminite. A Frutana é uma oligofrutose, derivado das raízes da chicória (*Cichorium intybus*). As frutanas podem ser classificadas em: frutanas do tipo levanas, que são polímeros lineares com ligações tipo $\beta(2-6)$, e inulina, que é um polímero linear com ligações glicosídicas $\beta(2-1)$. Sob determinadas condições de clima, a frutana nos caules de gramas pode atingir altas concentrações, o suficiente para causar laminite. Como nos outros dois modelos também é administrada através de sonda nasogástrica. Os eqüinos com laminite induzida com o modelo da Frutana desenvolveram diarreia, pirexia, aumento na frequência cardíaca e alterações hematológicas, similares ao modelo de indução com o CHO. Segundo esses pesquisadores, todos os cavalos sobreviveram 48h após a indução com a OF nas três doses utilizadas, nenhum desenvolveu eqüino desenvolveu cólica e todos os cavalos desenvolveram laminite clínica e lesões histológicas em pelo menos um casco.

2.4 Teorias da Patogenia

Segundo HOOD (1999) existem três teorias principais a respeito dos mecanismos responsáveis para o desenvolvimento da laminite: isquêmica/vascular, mecânica/traumática, e metabólica/enzimática.

2.4.1 Teoria Isquêmica/vascular

Envolve alterações na perfusão digital as quais atuam como gatilho da cascata de eventos que conduzem à disfunção metabólica e à falha estrutural das lâminas. Embora a patogenia da laminite não esteja inteiramente compreendida, os mecanismos vasculares iniciais são caracterizados pela hipoperfusão provocada pela venoconstrição, formação de edema laminar e a abertura de anastomoses arteriovenosa, permitindo que o sangue contorne o tecido laminar, conduzindo a isquemia tecidual, necrose das lâminas interdigitais e finalmente a falha mecânica com rotação ou afundamento da falange distal dentro do casco (GARNER et al., 1975a, ROBINSON et al., 1976, ALLEN et al., 1990).

A teoria preconiza que a ocorrência de venoconstrição e conseqüente pressão hidrostática elevada de fluido intersticial impedem o fluxo sangüíneo na microcirculação lamelar causando necrose isquêmica da lâmina epidérmica (ALLEN et al., 1990). A principal hipótese para explicar a diminuição da perfusão dos vasos digitais é a da vasoconstrição. Evidências de vasoconstrição originaram-se de estudos do fluxo sangüíneo realizados em modelos de perfusão do casco (BAXTER et al., 1989a). Estes pesquisadores sugeriram que a vasoconstrição da porção venosa da circulação resultaria em aumento da pressão capilar e, conseqüentemente, edema dentro do estojo córneo. Devido à localização das lâminas entre a muralha do casco e a falange distal, esse edema aumentaria a pressão intersticial produzindo colapso dos vasos, promovendo a “síndrome compartimental”. A combinação de aumento da pressão intersticial e venoconstrição diminuiriam o fluxo sangüíneo, produzindo necrose isquêmica (BAXTER, et al., 1989a; MOORE et al., 1989; ALLEN, et al., 1990; BAXTER, 1994).

ALLEN et al (1990) relataram que os cavalos desenvolvem a síndrome compartimental dentro do dígito durante a fase prodrômica da laminite e que esta conduz a isquemia. A hipótese destes autores é que a redução do fluxo sanguíneo é favorecida pela abertura das anastomoses arteriovenosas em nível de banda coronária. As lâminas digitais sofrem necrose após isquemia prolongada, o que acarreta lesões lamelares e, conseqüentemente, rotação ou afundamento da falange distal (BAXTER, 1986).

PERONI et al. (2006) analisaram a resposta a receptores agonistas alfa-adrenérgicos, felinefrina, 5-HT, prostaglandina $F_{2\alpha}$, e ET-1 em veias e artérias e observaram concentração-dependente no uso destas substâncias. Entretanto as veias eram significativamente mais sensíveis do que as artérias, demonstrando predisposição a venoconstrição nas lâminas dérmicas eqüina.

Recentemente quantidade considerável de compostos monoaminas, tais como: tiramina, triptamina e feniltilamina, foram descritos no conteúdo cecal de eqüinos (BAILEY et al., 2002 e 2004). Alguns desses compostos são estruturalmente similares aos vasoconstritores endógenos, como o 5-Hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) e catecolaminas (epinefrina, norepinefrina e dopamina), e são potentes vasoconstritores de veias e artérias digitais isoladas “in vitro” (ELLIOTT et al., 2003), tendo sua produção aumentada quando o conteúdo cecal é incubado “in vitro” com fontes de carboidratos (BAILEY et al., 2002).

EADES et al. (2007) em estudos de alterações hemodinâmicas de cavalos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos verificaram que o aumento concomitante no sangue venoso da ET-1 imunoreativa, concentrações de insulina, glicose e dos agregados plaqueta-neutrófilos suportam o papel de disfunção endotelial na patogênese da laminite induzida por CHO. Estes pesquisadores também observaram que a concentração plasmática de óxido nítrico no sangue venoso digital estava mais elevada do que no sangue venoso jugular, refletindo maior necessidade de substâncias vasodilatadoras na circulação digital sob circunstâncias normais.

2.4.2 Teoria Mecânica/traumática

Baseada na laminite resultante de trauma direto ao dígito e não de doenças sistêmicas preliminares (HOOD, 1999). Exemplos comuns de laminite causadas por traumas estão ligados ao afundamento da falange distal, devido a excessiva sustentação do peso no membro de apoio que ocorre durante a claudicação grave do membro contra-lateral pode produzir laminite, assim como pelo trabalho pesado em piso duro ou a extrema exaustão ou desidratação (HOOD, 1999). Os mecanismos exatos que conduzem à falha estrutural das lâminas são desconhecidos, mas diversas hipóteses foram sugeridas. A força excessiva aplicada sobre as lâminas dérmicas e epidérmicas do casco pode iniciar uma resposta inflamatória com vasos-espasmo, relacionado ao aumento da pressão hidrostática capilar, conduzindo, desse modo, à formação do edema o que propiciaria condições semelhantes às aquelas que ocorrem na síndrome compartimental bem como as descritas na teoria isquêmico/vascular. Outra hipótese é que a aplicação excessiva de força resulta em separação entre a lâmina dérmica e epidérmica, seguida de resposta inflamatória e/ou vasos-espasmos conduzindo aos danos isquêmicos das lâminas interdigitais (HOOD, 1999).

2.4.3 Teoria Tóxica/enzimática

O evento fundamental que conduz à falha das interdigitações lamelares é a presença de toxinas carregadas pelo sangue nas lâminas epidérmicas, tendo por resultado a desunião entre lâminas epidérmicas secundárias com as lâminas dérmicas

secundárias (POLLITT, 1999). POLLITT & DAVIES (1998) afirmaram que na fase prodrômica da laminite ocorre vasodilatação e não vasoconstrição. Esses autores constataram aumentos na temperatura do casco na fase de desenvolvimento da lesão, correlacionando esses achados com a ocorrência de vasodilatação do dígito. ROBINSON et al. (1990) e TROUT et al. (1990) também afirmaram que a laminite é precedida por aumento do fluxo de sangue na região laminar.

POLLITT & DARADKA (1998) relatam que os alvos das toxinas são os mediadores enzimáticos de remodelação que fazem parte dos processos normais envolvidos na movimentação e proliferação contínua das células basais responsáveis pela formação da muralha do casco. A membrana basal (MB) constituída de proteínas colagenosas como o colágeno tipo IV e não colagenosas como proteoglicanas e glicoproteínas, das quais a principal é a laminina, sofre degradação enzimática por ação de metaloproteinases (JOHNSON et al., 2000). POLLITT (1999) considerou a possibilidade da ativação descontrolada de metaloproteinase ser um evento importante e precoce na patogênese da laminite eqüina.

Recentemente foram isolados dois membros da família da matriz de metaloproteinase, as MMP-2 e MMP-9 de lâminas da muralha de cascos normais, de cultivos de lamelas expostas e cultura de tecido médio, onde surgiu a hipótese de que a ativação da matriz de metaloproteinase seria a responsável pela separação das células epidérmicas basais da membrana basal, que ocorre na laminite e que este processo pode ser inibido pelo inibidor de metaloproteinase (POLLITT et al., 1998).

Outra teoria formulada por POLLITT & DAVIES (1998) e JOHNSON et al. (1998) sugere que o *Streptococcus bovis*, na fase prodrômica da laminite, seria o responsável por substâncias que ativariam a metaloproteinase causando degeneração da membrana basal e conseqüente desorganização das lâminas dérmicas e epidérmicas.

Segundo POLLITT (1996) e POLLITT & DAVIES (1998) a laminite ocorreria em conseqüência da ação da metaloproteinase ativada por moléculas com baixo peso molecular e não pela formação de microtrombos onde as lesões isquêmicas e as coagulopatias sistêmicas ocorreriam secundariamente e/ou paralelamente às lesões da MB. PASS et al. (1998) em pesquisa com o metabolismo da glicose na laminite

relataram que, a separação da MB da célula epidérmica basal ocorreria quando agentes como o 2-deoxiglicose e o acetato aminofenilmercúrico (reconhecido como ativador da metaloproteinases) inibissem a utilização da glicose pelo tecido do casco. Todavia, ainda não se sabe se a inibição do metabolismo da glicose pode causar o desenvolvimento da laminite “in vivo” como aconteceu nesta pesquisa “in vitro”.

Em que pese existirem atualmente, três teorias principais a respeito da patogenia da laminite aguda nos eqüinos, há provavelmente outros múltiplos fatores que participam da patogenia da doença.

III. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) possui certas características que o fazem diferente dos neurotransmissores restantes. Em primeiro lugar o NO é uma molécula gasosa que atravessa facilmente as membranas celulares, não podendo, por isto, ser armazenado no interior de vesículas e oxidado como outros neurotransmissores convencionais (GABA, glutamato, dopamina, acetilcolina). Assim, quando uma célula produz NO, este escapa através da membrana celular difundindo-se em suas proximidades. Essa mesma propriedade de atravessar as membranas permite ao NO afetar outras células sem que estas apresentem receptores em sua superfície (FLORA & ZILBERSTEIN, 2000).

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel, altamente lipofílico sintetizado por uma ampla variedade de tipos celulares que incluem células epiteliais, nervosas, endoteliais e inflamatórias. É um importante sinalizador intra e extracelular, e atua induzindo a guanil ciclase, que produz guanosina monofosfato cíclico (GMPc) que induz, entre outros efeitos, o relaxamento do músculo liso, provocando como ações biológicas a dilatação de vasos e brônquios.

No organismo, o óxido nítrico é sintetizado a partir de uma enzima, a óxido nítrico sintetase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina que produz NO e L-citrulina,

necessitando da presença de dois cofatores, o oxigênio e o fosfato dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NADPH) (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

Existem três formas de NOS, duas denominadas constitutivas e dependentes do cálcio/calmodulina (cNOS), que são a endotelial e a neuronal, as quais sintetizam NO em condições normais, e a independente do cálcio (iNOS), que não se expressa ou o faz, em condições fisiológicas, em pouca quantidade (FLORA & ZILBERSTEIN, 2000).

O endotélio (a fina camada de células mais interna dos vasos sanguíneos) usa o óxido nítrico para comandar o relaxamento do músculo liso da parede do vaso, fazendo com que este dilate aumentando assim o fluxo sanguíneo e diminuindo a pressão arterial. O uso da nitroglicerina e de seus derivados no tratamento da doença coronária se justifica pelo fato destes compostos, ao serem convertidos em NO por um processo não muito bem conhecido, dilatarem as artérias coronárias. Os macrófagos, células do sistema imunitário, produzem NO como composto nocivo para bactérias, devido à sua capacidade de formar espécies reativas de azoto. Porém em certas circunstâncias isto pode trazer efeitos colaterais indesejáveis, como na septicemia generalizada na qual há produção exagerada de NO pelos macrófagos, com conseqüente vasodilatação generalizada o que pode ser uma das causas da hipotensão na septicemia (ARCHE, 1993).

O óxido nítrico tem também funções de neurotransmissor entre as células nervosas. Ao contrário dos outros neurotransmissores que funcionam geralmente no sentido da membrana pré-sináptica para a membrana pós-sináptica, NO, por ser um gás muito solúvel, pode atuar em todas as células adjacentes paracrinamente e autocrinamente, sem estar necessariamente envolvida uma sinapse física. Pensa-se que esta propriedade possa estar envolvida na formação da memória (PATEL et al., 2001).

A descoberta das funções do NO na década de 80 vieram surpreender e mexer com a comunidade científica. Foi nomeada "Molécula do Ano" em 1992 pela revista *Science*, tendo sido fundada a "Nitric Oxide Society" e criada uma revista científica só para estudos relacionados com esta molécula. O Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1998 foi atribuído a Ferid Murad, a Robert F. Furchgott e a Louis Ignarro

pela descoberta das propriedades sinalizadoras do óxido nítrico (IGANARRO et al., 2007).

Os nitrovasodilatadores relaxam a maioria dos músculos lisos, incluindo o das artérias e veias. Dois desses medicamentos têm sido utilizados farmacologicamente, o trinitrato de gliceril (TNG), também conhecido por trinitroglicerina, e o nitroprussiato de sódio (NPS). Baixas concentrações de trinitroglicerina produzem dilatação das vênulas que predomina sobre a das arteríolas. A aparente seletividade de alguns nitrovasodilatadores para diferentes leitos vasculares pode estar relacionada à sua biodisponibilidade e ao metabolismo celular diferencial dos fármacos em óxido nítrico. O óxido nítrico é considerado o princípio intermediário ativo na ação desta ampla classe de fármacos (MURAD, 1986).

Alterações na produção de óxido nítrico pelas células endoteliais dentro do casco resultariam em vasoconstrição e predisporiam as lâminas a injúrias isquêmicas. Estudos recentes discutem a função do óxido nítrico na regulação do fluxo sangüíneo na laminite. De acordo com HINCKLEY et al. (1996), a aplicação de trinitroglicerina, um doador de óxido nítrico, em casco de pôneis acometidos por laminite resultou em redução nos sinais clínicos de claudicação.

Estes pesquisadores utilizaram precursores de óxido nítrico no tratamento da fase aguda da laminite, quando os sinais de claudicação já estavam bem definidos, demonstrando a eficiência desse fármaco na redução da claudicação. Entretanto, SAMPAIO et al. (2004) não encontraram resultados semelhantes em cavalos. Inúmeras pesquisas foram conduzidas com o intuito de determinar com maior precisão a eficiência dessa medicação. Todavia, até o presente momento esses debates não foram enriquecidos por novas informações. Acredita-se que a ação terapêutica da trinitroglicerina deva-se a seus mecanismos vasodilatadores, corroborando positivamente os argumentos dos defensores da teoria vasoconstritora.

Diante destas considerações, algumas questões de relevância se destacam, a saber:

1) Quais e de que magnitude são as alterações ultra-estruturais que ocorrem no tecido laminar na fase inicial da laminite?

2) A administração precoce de substâncias vasodilatadoras minimiza a ocorrência de alterações celulares na laminite?

As respostas a estes questionamentos passam necessariamente por estudos clínicos, alguns já realizados, e ultra-estruturais, que são objetivos desse projeto, e para o qual se delineou os seguintes objetivos:

Objetivos gerais

1. Estudar qualitativa e quantitativamente as ultra-estruturas do tecido laminar do casco de eqüinos normais e com laminite.
2. Avaliar ultra-estruturalmente a eficiência de substância vasodilatadora na laminite.
3. Avaliar alterações morfológicas a eficiência de substância vasodilatadora na laminite.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar alterações morfológicas ópticas da estrutura lamelar do casco.
2. Quantificar o comprimento das lâminas epidérmicas primárias e secundárias
3. Quantificar a largura das lâminas epidérmicas primárias e secundárias
4. Quantificar a área das células basais;
5. Quantificar a área dos núcleos;
6. Análise estrutural da MB (largura e camadas)
7. Análise do citoesqueleto
8. Análise dos pares fibroreticulares
9. Análise dos hemidesmosomos

IV. Referências ¹

- ACKERMAN, N., GARNER, H.E., COFFMAN, J.R., et al. Angiographic appearance of the normal equine foot and alterations in chronic laminitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 166, n.1, p.58-62, 1975.
- ALLEN, D., J.R., KORTHUIS, R.J., CLARK, E.S. Capillary permeability to endogenous macromolecules in the equine digit. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49: p.1609-1612, 1988a
- ALLEN D., J.R., KORTHUIS R.J., CLARK S. Evaluation of Starling forces in the equine digit. **Journal of Applied Physiology**, v. 64, p. 1580-1583, 1988b.
- ALLEN, D., JR., CLARK, E.S., MOORE, J.N., et al. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p.1930-1934, 1990.
- ARCHE, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **The FASEB Journal**, v.7, p.349-360, 1993.
- BAILEY, S.R., ELLIOTT, J. Plasma 5-hydroxytryptamine constricts equine digital blood vessels in vitro: implications for pathogenesis of acute laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.30, p. 124-130, 1998.
- BAILEY, S.R., RYCROFT, A., ELLIOTT, J. Production of amines in equine cecal contents in an in vitro model of carbohydrate overload. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2656-2662, 2002.
- BAILEY, S.R., MARR, C.M., ELLIOTT, J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horses. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 129-142, 2004.

¹ De acordo com a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) – N.B.R. – 6023 Ago/2002.

- BAXTER, G.M. Equine laminitis caused by distal displacement of the distal phalanx: 12 cases (1976-1985). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 326-329, 1986.
- BAXTER, G.M., LASKEY, R.E., TACKETT, R.L., et al. In vitro reactivity of digital arteries and veins to vasoconstrictive mediators in healthy horses and in horses with early laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, p.508-517, 1989a.
- BAXTER, G.M., TACKETT, R.L., MOORE, J.N. Reactivity of equine palmar digital arteries and veins to vasodilating agents. **Veterinary Surgery**, v.18, p.221-226, 1989b.
- BAXTER, G. M. Acute laminitis. **The Veterinary Clinics of North America**, v.3, p.627-42, 1994.
- BRYANT, C.E., ELLIOTT, J. Nitric oxide: a friend or foe? **Equine Veterinary Education**, v.6, n.2, p.59-64, 1994.
- BURCH, G.E., HARB J.M, SUN C.S. Fine structure of digital vascular lesions in Raynaud's phenomenon and disease. **Angiology**, v.30, p. 361-376, 1979.
- CERQUEIRA, N.F., YOSHIDA, W.B. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p.417-423, 2002.
- COFFMAN, J.R; JOHNSON J.H., FINOCCHIO E.J., GUFFY M.M. Biomechanics of pedal rotation in equine laminitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, p.219-221, 1970.
- COFFMAN, J.R., GARNER, H.E., HAHN, A.W., et al. Characterization of refractory laminitis. 18th annual meeting of **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, p.351-358, 1972.
- DUNLOP, RH, WILLIAMS, DJ. *Veterinary medicine: an illustrated history*. St. Louis: Mosby, 1996.
- 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, and glucose in blood obtained from horses following carbohydrate overload. **American Journal of Veterinary Research**, v.68, n.1, p.87-94, 2007.

- EATON, S.A., ALLEN, D., EADES, S.C., et al. Digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis induced by an aqueous extract of black walnut (*Juglans nigra*) in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p.1338-1344, 1995.
- ELLIOTT, J., BERHANE, Y., BAILEY, S. R. Effects of monoamines formed in the cecum on equine digital blood vessels and platelets. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, p.1124-1131, 2003.
- FARACI, F.M., HEISTAD, D.D. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. **Physiological Reviews**. v.78, p.53–97, 1998.
- FLORA FILHO, R., ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.3, p.265-271, 2000.
- FONTAINE, G.L., BELKNAP, J.K., ALLEN, D., et al. Expression of interleukin-1beta in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.714-720, 2001.
- GALEY, F.D., TWARDOCK, A.R., GOETZ, T.E., et al. 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.
- GALEY, F.D., WHITELEY, H.E., GOETZ, T.E., et al. Black walnut (*Juglans nigra*) toxicosis: a model for equine laminitis. **Journal of Comparative Pathology**, v.104, p.313-326, 1991.
- GARNER, H.E., COFFMAN, J.R., HAHN, A.W., et al. Equine laminitis and associated hypertension: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association** v.166, p.56-57, 1975.(a)
- GARNER, H.E., COFFMAN, J.R., HAHN, A.W., et al. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.4, p.441-444, 1975.(b)

- GARNER, H.E., MOORE, J.N, JOHNSON, J.H., et al. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.10, n.4, p.249-252, 1978.
- HINCKLEY, K.A., FEARN, S., HOWARD, B.R., et al. Nitric oxide donors as treatment for grass induced acute laminitis in ponies. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p.17-28, 1996.
- HOOD, D.M., AMOSS, M.S., HIGHTOWER, D. Equine laminitis I: Radioisotopic analysis of the hemodynamics of the foot during the acute disease. **Journal Equine Medical Surgery**, v. 2, p. 439, 1978.
- HOOD, D.H. Current concepts of the physiopathology of laminitis. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**. v. 25, p.13-20, 1980.
- HOOD, D.M., GROSENBAUGH, D.A., MOSTAFA, M.B. et al. The role of vascular mechanisms in the development of acute laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 4, p.228-34, 1993.
- HOOD, D.M. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. **The Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, v.15, p.321-343, 1999.
- HOOD, D.M., WAGNER, I.P., BRUMBAUGH, G.W. Evaluation of hoof wall surface temperature as an index of digital vascular perfusion during the prodromal and acute phases of carbohydrate-induced laminitis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.1167-1172, 2001.
- HUNT, R.J. The pathophysiology of acute laminitis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.13, p. 401-407, 1991.
- IGNARRO, L.J., OLSON, S. GARBÁN, H.J. NO, NO y NO•: Oxido Nítrico en la Fisiología Vascular. Department of Molecular and Medical Pharmacology, UCLA School of Medicine. *Visto em:*
<http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeTrece/Articulos/MedicinaMolecular/ArchivosHTML/MedicinaMolecular.pdf>. Acessado em 20 de julho, 2007.
- JOHNSON, P.J., TYAGI, S.C., KATWA, L.C., et al. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. **The Veterinary Record** v.142, n.15, p.392-396, 1998.

- JOHNSON, P.J., KREEGER, J.M., KEELER, M., GANJAM, V.K., MESSER N.T. Serum markers of lamellar basement membrane degradation in horses affected with laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.32, n.6, p.462-68, 2000.
- JONES, W.E. Genética e Criação de Cavalos ed. Roca, cap. 1, p.3-19, 1987.
- JORIS, I., MAJNO, G. Endothelial changes induced by arterial spasm. **American Society of Veterinary Clinical Pathology**, v. 102, p. 346-358, 1981.
- KAINER, R.A. Clinical anatomy of the equine foot. **The Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, v.5, p.1-27, 1989.
- KATWA, L.C., JOHNSON P.J., GANJAM V.K., et al. Expression of endothelin in equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.31, n. 54, p.243-247, 1999.
- MINNICK, P.D., BROWN, C.M., BRASELTON, W.E., et al. The induction of equine laminitis with an aqueous extract of the heartwood of black walnut (*Juglans nigra*). **Veterinary and human toxicology**, v. 29, p.230-233, 1987.
- MOLYNEUX, G.S., HALLER, C.J., MOGG, K., et al. The structure, innervation and location of arteriovenous anastomoses in the equine foot. **Equine Veterinary Journal**, v.26, p.305-312, 1994.
- MOORE, J.N., GARNER, H.E., BERG, J.N., et al. Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis: a preliminary report. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, p. 722-723, 1979.
- MOORE, J.N., GARNER, H.E., COFFMAN, J.R. Haematological changes during development of acute laminitis hypertension. **Equine Veterinary Journal**, v.13, n.4, p.204-242, 1981.
- MOORE, J.N., ALLEN, D, JR., CLARK, E.S. Pathophysiology of acute laminitis. **The Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, v. 5, p. 67-72, 1989.
- MOSTAFA, M.B. Studies on experimental laminitis in the horse. College of Veterinary Medicine. Cairo: Cairo University, 1986.
- MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.78, p.1-5, 1986.
- OBEL, N. Studies on the histopathology of acute laminitis. Uppsala, Sweden: Almquist and Wiskells, 1948.

- PASS, M.A., POLLITT, S., POLLITT, C.C. Decreased glucose metabolism causes separation of hoof lamellae in vitro: a trigger for laminitis? **Equine Veterinary Journal**. Suppl. v.26, p.133-138, 1998.
- PATEL, KP, LI Y-F, HIROOKA, Y. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, p.814-824, 2001.
- PERONI, F.J., MOORE, J.N., NOSCHKA, E., GRAFTON, M.E., ACEVES-AVILA, M., LEWIS, S.J., ROBERTSON, T.P. Predisposition for venoconstriction in the equine laminar dermis: Implications in equine laminitis. **Journal of Applied Physiology**, v.100, p. 759-763, 2006.
- POLLITT, C.C., MOLYNEUX, G.S. A scanning electron microscopical study of the dermal microcirculation of the equine foot. **Equine Veterinary Journal**, v.22, p.79-87, 1990.
- 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., DAVIES, C.T. Equine laminitis: its development coincides with increased sublamellar blood flow. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. v. 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. v.26, p. 139-144, 1998.
- POLLITT, C.C., PASS, M.A., POLLITT, S. Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. v.26, p. 119-124, 1998.
- POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.45, p.188-192, 1999.
- POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. 10th Annual Convention. American Farriers Association. Proc. Kansas City, Missouri. p. 99-101. february 28 - march 3, 2001.

- POLLITT, C.C, VAN EPS, A.W. Equine laminitis; a new induction model based on alimentary overload with fructan. **7th International Equine Colic Research Symposium**, 87, 2002.
- REED, R.J. Cutaneous vascular and perivascular inflammation: diagnostic requisites and immunologic correlates and postulates in Cutaneous Vasculidies. **American Society of Veterinary Clinical Pathology**, p.1-13, 1977.
- ROBINSON, N.E., SCOTT, J.B., DABNEY, J.M., et al. Digital vascular responses and permeability in equine alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p.1171-1174, 1976.
- ROBINSON, N.E. Digital blood flow, arteriovenous anastomoses and equine. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 6, p. 381-383, 1990.
- RUCKER, A., REDDEN, R.F., ARTHUR, E.G., REED, S.K., HILL, B.W., DZIUBAN, E.M., RENFRO, D.C. How to perform the digital venogram. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 52, p. 526-529, 2006.
- SAMPAIO, R. C. L., CANOLA, J. C., LACERDA NETO, J. C., MORAES, J. R. Histologic alterations of the basement membrane of the dermal and epidermal layers of the hoof in horses with acute laminitis. **International Journal of Morphology**, v. 22, n. 4, p.307-312, 2004.
- SCHNEIDER, D.A., PARKS, A.H., EADES, S.C., et al. Palmar digital vessel relaxation in healthy horses and in horses given carbohydrate. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, p.233-239, 1999.
- SMITH, F. *The early history of veterinary literature and British development*. London: JA Allen & Co., 1919.
- SPROUSE, R.F., GARNER, H.E., GREEN, E.M. Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate induced laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 1, p. 25-28, 1987.
- STUMP, J.E. Anatomy of the normal equine foot, including microscopic features of the laminar region. **Symposium on the Equine Foot**, v. 15, p. 1588-1599, 1967.

- TROUT, D.R.; HORNOF, W.J.; LINFORD, R.L. et al. Scintigrafic evaluation of digital circulation during the developmental and acute phases of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 6, p. 416-421, 1990.
- WAGNER, IP, HEYMERING, H. Historical perspectives on laminitis. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v.15, p.295-309, 1999.
- WEISS, D.J., GEOR, R.J., JOHNSTON, G., et al. Microvascular thrombosis associated with onset of acute laminitis in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 606-612, 1994.
- WEISS, 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.
- WEISS, D.J., EVANSON, O.A., MCCLENAHAN, D., et al. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n.12, p.1376–1380, 1997.
- WEISS, D.J., EVANSON, O.A., GREEN, B.T., et al. In vitro evaluation of intraluminal factors that may alter intestinal permeability in ponies with carbohydrate-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, p.858-861, 2000.

CAPÍTULO 2: ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS LÂMINAS DÉRMICAS E EPIDÉRMICAS DO CASCO DE EQÜINOS COM LAMINITE EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TRINITROGLICERINA

RESUMO – Com este trabalho objetivou-se avaliar a ação de um vasodilatador nas lâminas dérmicas e epidérmicas dos cascos de eqüinos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos. Foram utilizadas amostras do casco de quinze eqüinos adultos saudáveis, de acordo com o protocolo descrito por POLLITT (1994). Estes animais foram distribuídos em três grupos de cinco animais: Controle, Laminite e Laminite + Trinitroglicerina. Para as análises pela microscopia ótica foram selecionadas as interfaces entre as lâminas epidérmicas e dérmicas dos cascos. Foram analisados o comprimento das lâminas epidérmicas primárias (LEP) e secundárias (LES), assim como a largura de ambas. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio de Análise de Variância e pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. A indução da laminite, por meio da sobrecarga de carboidratos, alterou o comprimento e a largura das lâminas epidérmicas primárias e secundárias nos dois grupos induzidos (Grupos Laminite e Laminite+ Trinitroglicerina). Na análise estatística observou-se que há diminuição no comprimento das LEP, especialmente no Grupo Laminite + Trinitroglicerina e aumento no comprimento das LES no Grupo Laminite quando comparados com o Grupo Controle. A largura das LEP nos eqüinos do Grupo Laminite aumentou e no Grupo Laminite + Trinitroglicerina reduziu. Os dois grupos induzidos tiveram redução na largura das LES, porém, o Grupo Laminite + Trinitroglicerina apresentou maior redução. Não há relatos na literatura que corroborem estes achados e possibilitem comparações. Diante deste fato hipotetiza-se que enquanto não ocorre afastamento entre a falange distal e a muralha do casco a indução da laminite promove inicialmente o despreendimento das LES, as quais se afinam e alongam, enquanto as LEP se retraem. Tais achados estão associados à lesão na membrana basal. O estudo

morfométrico destacou a ocorrência de processos de retração ainda não descritos na literatura, o qual pode ser a primeira lesão ocorrida nesta afecção juntamente com a ação de enzimas que fragilizem as fibras de ancoragem, levando a separação das LES da membrana basal. A relevância do achado deve receber estudos adicionais com a finalidade de compreender melhor os mecanismos envolvidos.

I. INTRODUÇÃO

A laminite resulta em degeneração, necrose e inflamação das lâminas dérmicas e epidérmicas do casco. COFFMAN et al. (1970) realizaram angiovenografias na fase prodrômica da laminite e determinaram a ocorrência de oclusões do arco terminal e artérias circunflexas, além da diminuição do fluxo sanguíneo no plexo artério-venoso do bulbo do casco e do corium, levando a degeneração da região laminar. A ligação entre as lâminas dérmicas e epidérmicas é o único meio da sustentação da falange distal dentro do casco. Se esta ligação inter-laminar for destruída, a falange distal pode rotacionar ou afundar.

Segundo LARSSON et al. (1956), o casco é uma continuação modificada da epiderme da pele ao qual falta o estrato granuloso e o estrato lúcido. Adicionalmente, enquanto na pele se forma quérato-hialina, de consistência mais macia, nos cascos a proteína predominante é a queratina de maior dureza e resistência. Histologicamente a epiderme do casco é caracterizada pela fina camada interna, o estrato germinativo, próximo ao “corium” e outra camada mais grossa, o estrato córneo. O estrato germinativo forma uma contínua camada sobre o “corium”, e as várias partes do casco crescem como resultado da proliferação desta camada.

Por sua vez o estrato germinativo é subdividido em duas camadas, o estrato basal ou cilíndrico e o estrato espinhoso. O estrato basal é a camada profunda da epiderme e consiste em uma única camada de células próximas ao “corium”. O estrato espinhoso é formado por células que migraram da camada basal para a porção central da lâmina epidérmica secundária (LES) e sofreram queratinização. Na porção central da LES as células do estrato espinhoso, também denominadas queratinócitos, se distribuem em fileiras formando uma ou várias camadas. A porção da camada espinhosa próxima ao estrato córneo aonde ocorre a queratinização em grande

quantidade é denominada de zona transicional ou zona queratogênea (LARSSON et al., 1956; TOMLINSON et al., 2007).

Ao realizar estudo da histologia do casco, STUMP (1967) verificou que durante o desenvolvimento embrionário do casco, a região laminar é formada pelo crescimento do estrato germinativo para dentro do “corium”. A lâmina epidérmica primária (LEP) faz parte do estrato córneo, sendo composta de queratina dura não tubular. São produzidas pelas lâminas do estrato germinativo. As lâminas epidérmicas primárias cornificam e são empurradas para além da borda do sulco coronário. As lâminas epidérmicas secundárias também são compostas pelo estrato germinativo, mas sua queratinização é apenas parcial. O estrato basal é contíguo com as lâminas dérmicas e dá forma a uma única camada de células em torno da superfície das lâminas epidérmicas secundárias. A porção central das lâminas epidérmicas secundárias é composta pelo estrato espinhoso, constituído de células densas, e está unido pela base das lâminas epidérmicas primárias.

A histopatologia da laminite eqüina vem sendo estudada à aproximadamente 60 anos, sendo descrita em vários estágios de seu desenvolvimento (OBEL 1948; STUMP, 1967; GARNER et al. 1975; ROBERTS et al. 1980; LINFORD 1987). Os primeiros estudos se iniciaram com OBEL (1948), que conseguiu reproduzir a doença fornecendo aos cavalos uma papa de amido de milho e classificou a claudicação proveniente da laminite em graus, conhecida como graus de Obel.

Estudos conduziram OBEL (1948) e EKFAŁCK et al. (1992) a concluir que a epiderme lamelar era o local preliminar da lesão na laminite, associado a mudanças repentinas nas organelas citoplasmáticas chaves. Devido à complexa anatomia e localização atrás da parede do casco, as estruturas lamelares provaram ser inevitavelmente muito difícil de estudar, nos termos de seguir os processos patológicos que ocorrem nos estágios de desenvolvimento e agudo. A severidade da patologia da epiderme lamelar foi considerada por ROBERTS et al. (1980) e foi correlacionada diretamente aos sinais clínicos. Exames de biopsias feitos da parede dorsal do casco de cavalos, que desenvolveram a laminite induzida pelo carboidrato, permitiram a LINFORD (1987) descrever a seqüência de deformações sofridas pela epiderme

lamelar quanto a severidade da claudicação. Na microscopia ótica, secções dos tecidos lamelares corados com hematoxilina eosina (HE), permitiram a estes autores descrever as mudanças que ocorrem dentro das lâminas epidérmicas primárias e secundárias.

Estudos morfológicos associados à laminite focalizaram-se nas modificações ocorridas após observação de claudicação, estendendo-se desde a sua ocorrência até 72 horas após. Algumas observações descrevem alterações presentes antes ou coincidentes com o início da claudicação. Neste momento, as alterações histológicas surgem nos vasos da circulação digital. Apenas quatro horas depois do aparecimento da claudicação, quando se observa inchaço das células endoteliais e edema. Congestão e obstrução eritrocítica dos capilares laminares estão presentes no período de oito horas. Infiltrado perivascular aparece entre seis e doze horas e então diminui à medida que os leucócitos migram para as camadas epidermais. Células do endotélio arteriolar estão deformadas pelos processos citoplasmáticos estendendo-se para a superfície luminal. Trombos microvasculares e edema severo aparecem em 24 horas e ocorre hemorragia na lâmina dérmica primária em 72 horas (MOSTAFA, 1986). Segundo BURCH et al., (1979), as alterações vasculares assemelham-se a vasoconstrição observada no choque hemorrágico e na doença vasoespástica humana. As pontes endoteliais presentes na laminite aguda são semelhantes às que se desenvolvem pelo contato entre células após vasoconstrição intensa (JORIS & MAJNO, 1981). Distorções anatômicas das lâminas ocorrem apenas oito horas após a claudicação. Há adelgaçamento e afunilamento das estruturas lamelares acompanhadas por redução, achatamento e deslocamento das camadas epiteliais (OBEL, 1948; MOSTAFA, 1986; POLLITT, 1996). Estudos realizados para examinar o diâmetro e a distribuição do suprimento vascular dentro do casco distal usando técnica angiográfica em cavalos normais, cavalos com claudicação aguda e em cavalos cronicamente afetados sob anestesia geral, revelaram aumento no diâmetro dos grandes vasos e diminuição no diâmetro dos vasos terminais do casco durante a fase aguda. Sendo que estes dados foram consistentes com a vasoconstrição (COFFMAN et al., 1970).

Em estudos envolvendo o uso de radionúcleos para avaliar a distribuição funcional do fluxo digital capilar e a presença de desvios arteriovenosos significantes, foram obtidas imagens que revelaram a diminuição na perfusão em todos os cavalos com laminite aguda. As lesões fisiopatológicas, obtidas com a arteriografia, indicaram vasoconstrição (HOOD et al., 1978).

COFFMAN et al. (1970) observaram que a queratinização do casco é complexa, sendo um processo altamente ativo que envolve a incorporação da metionina e da cisteína em células do estrato germinativo, produzindo substâncias oncogênicas no casco. A queratinização começa na camada profunda do estrato espinhoso e ocorre constantemente na maturação celular ligando o bissulfeto para formar queratina. Na laminite, as células que passam para o estrato espinhoso não amadureceram suficientemente para a incorporação da cisteína, com isto a queratina produzida tem baixa qualidade.

POLLITT (1996) classificou as alterações observadas nas lâminas epidérmicas, de cavalos com laminite aguda, de acordo com a severidade das lesões. Esse sistema de classificação baseou-se principalmente nas alterações da membrana basal (MB) da lâmina, perfeitamente visível quando se corou o tecido conectivo com ácido periódico de Schiff (PAS) e ácido periódico de metanamine de prata (PASM). O sistema histopatológico de classificação correlacionou o grau de claudicação, segundo classificação de Obel, no momento do sacrifício, e aparentemente descreveu de forma acurada a severidade da laminite. Neste estudo POLLITT (1996), relatou que a lesão primária ocorria em nível da membrana basal (MB) na interface entre as lâminas secundárias e a derme.

Segundo YELLE (1986) e BAXTER (1996), os tratamentos médicos e cirúrgicos da laminite têm sido freqüentemente revisados e atualizados, e envolvem atenção a todos os sistemas afetados e não somente aos cascos. A terapia da laminite é embasada em extensa gama de fármacos e inclui geralmente analgésicos, vasodilatadores, aspirina e heparina. Auxílios adicionais de manejo também são recomendados e utilizados (WEISS, 1997; POLLIT & DAVIES, 1998). A utilização de

precursores de óxido nítrico, denominados nitrovasodilatadores, foi apresentada por BRYANT & ELLIOTT (1994) como promissores na terapia da laminite.

Em que pese à realização de inúmeros trabalhos sobre a morfologia do casco de eqüinos normais e com laminite, não foram encontrados na literatura consultada estudos de caráter morfométrico. Diante deste fato, decidiu-se realizar a morfometria das lâminas dos cascos de três grupos de eqüinos que foram previamente utilizados em estudo sobre a eficácia da Trinitroglicerina na prevenção da laminite.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizadas amostras do casco de quinze eqüinos adultos, sem raça definida, seis machos e nove fêmeas, com idades variando entre quatro e sete anos. A alimentação diária foi constituída de 2,0 kg de ração concentrada, fornecida uma vez ao dia, além de feno e sal mineral *ad libitum*. A água estava disponível em cochos apropriados colocados nas baias. Estes animais foram, distribuídos em três grupos, constituídos de cinco animais cada:

Grupo Controle: Formado por eqüinos hígidos, que não receberam sobrecarga de carboidrato e que por razões de ordem humanitária ou econômica foram submetidos à eutanásia (Grupo I).

Grupo Laminite: Constituído por eqüinos submetidos a jejum de 12 horas que receberam por meio de sonda nasogástrica, 17,6g de amido/kg de peso vivo (Maizena®)², diluído em solução aquosa 1:1, para indução de laminite. Estes animais não receberam nenhum tratamento (Grupo II).

Grupo Laminite + Trinitroglicerina: Os animais deste grupo receberam o amido na quantidade e diluição semelhantes ao grupo anterior. Ao completarem 24 horas após a

² Maizena® - UNILEVER DO BRASIL

administração da sobrecarga de carboidratos as faces palmares dos boletos dos membros torácicos foram tricotomizadas aplicando sobre estas dois sachês, em cada membro, contendo 10 mg de trinitroglicerina em cada sachê (Nitradisc®)³ os quais foram fixados sobre a pele com esparadrapo, permanecendo no local até completar-se 48 horas após a administração de carboidratos (Grupo III).

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar dos Animais (CEBEA) da FCAV/UNESP.

2.2 Análises histológicas

Após a eutanásia, a qual se deu nos eqüinos dos grupos induzidos 48 horas após a indução com carboidratos e, 24 a 26 horas após os primeiros sinais de claudicação, as extremidades distais dos quatro membros foram desarticuladas na altura da articulação metacarpo-falangeana e metatarso-falangeana, para os membros torácicos e pélvicos, respectivamente.

Os cascos foram seccionados com uma serra de fita, de acordo com o protocolo descrito por POLLITT (1996). Foi obtido fragmento retangular da muralha interna, na região da pinça, com lados medindo 1,0 x 0,5 cm e espessura de 0,1 cm, contendo a interface entre as lâminas dérmicas e epidérmicas.

Os fragmentos finais foram fixados em formol a 10 %, desidratados com álcool e incluídos em parafina. Cortes de 5 a 7 µm de espessura foram realizados, corando-se em seguida com hematoxilina-eosina (HE) ou ácido periódico de Schiff (PAS).

2.3 Morfometria

³ Nitradisc® 10 mg - SEARLE

No estudo morfométrico, foram selecionadas as interfaces entre as lâminas epidérmicas e dérmicas dos cascos desses eqüinos. Foi analisado o comprimento das lâminas epidérmicas primárias (LEP) e secundárias (LES) assim como a largura de ambas, utilizando-se um sistema de análise de imagem computadorizada (Imagem Pró Plus). As lâminas foram fotografadas utilizando-se microscópio de luz digital da marca Nikon e armazenadas em computador para posterior análise. Utilizou-se para análise, uma área representativa de 40 campos por animal, 200 campos por grupo, perfazendo um total de 600 campos.

2.4 Análise estatística

Os diferentes parâmetros estudados foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey, com nível de significância $P < 0,05$, realizado mediante o procedimento do SAS (Statistical Analysis System).

III. RESULTADOS

Na análise histológica do casco dos eqüinos do Grupo Controle (GI), observou-se que as lâminas epidérmicas primárias (LEP) constituem projeções do estrato córneo da muralha do casco e são compostas de queratina dura não tubular. A extremidade destas estruturas apresenta forma arredondada, com a aparência de folhas de palmeira.

Intercaladas entre as LEP, encontram-se as lâminas dérmicas primárias (LDP) nas quais foi possível verificar a presença de vasos entremeados no tecido conjuntivo. As lâminas epidérmicas primárias eram sempre mais largas que as lâminas dérmicas primárias (LDP), harmoniosas entre si e paralelas umas com as outras, tendo seu tecido

conectivo bem visível. Aparentemente, ocorria queratinização na base das lâminas epidérmicas primárias, fornecendo a sensação de crescimento perpendicular à muralha do casco, enquanto as LDP provinham do tecido de preenchimento anexo à falange distal (Figura 3A). A LEP possuía apêndices que contornavam toda sua extensão, lâminas epidérmicas secundárias (LES), entre cada LES eram vistas as lâminas dérmicas secundárias (LDS) penetrando profundamente as criptas das LES (Figura 3B).

As lâminas epidérmicas secundárias (LES) eram arredondadas em sua extremidade, com aparência de bastão (Figura 3C). Essas lâminas geralmente se posicionavam em direção à falange distal ou em um ângulo reto com o eixo queratinizado da lâmina epidérmica primária. A porção central da lâmina epidérmica secundária compõe o estrato espinhoso, o qual tem células raras e densas, unido a lateral das lâminas epidérmicas primárias. As LES eram sempre mais largas que as lâminas dérmicas secundárias, harmoniosas entre si e paralelas umas com as outras, tendo seu tecido conectivo bem visível. Nas LES eram visíveis as células basais, com seu núcleo de formato ovalado, situado no pólo apical das células basais (Figura 3D).

A indução da laminite por meio da sobrecarga de carboidratos alterou o comprimento e a largura das lâminas epidérmicas primárias e secundárias nos dois grupos induzidos (Grupo Laminite e Grupo Laminite + Trinitroglicerina) (Tabela 1).

As lâminas epidérmicas primárias nos Grupos Laminite e Laminite +Trinitroglicerina, tinham aparência de retração com afilamento de seus ápices (Figura 4A) e apresentaram em suas bases, material queratinizado proveniente das células basais, fornecendo a impressão de maturação celular precoce (Figura 4B).

As lâminas epidérmicas secundárias apresentaram estreitamento e alongamento com afilamento dos seus ápices e posicionamento irregular onde seu ápice apontava em várias direções. A distribuição simétrica regular da anatomia lamelar tinha desaparecido e ocorreu desigualdade no tamanho das LES (Figura 4C).

As lâminas dérmicas secundárias estavam ausentes em muitos pontos, juntamente com os vasos nelas existentes, fornecendo a sensação de retração. No lugar destas lâminas havia apenas um espaço vazio (Figura 4C).

As células basais das lâminas epidérmicas secundárias estavam com formato arredondado, próximos à membrana basal, e em muitos lugares, estas células não eram mais visualizadas. Alguns cortes apresentavam deformidades nas lâminas epidérmicas e dérmicas, aparecendo inclusive trombos e separação da LES da MB (Figura 4D). Notou-se a presença de degeneração nuclear principalmente das células basais situadas junto às LDS nas quais o tecido conjuntivo estava ausente, os núcleos destas células apresentavam-se pequenos e de coloração escura, indicando picnose. Também foi observada a existência de núcleos em cariorrexis e cariólise.

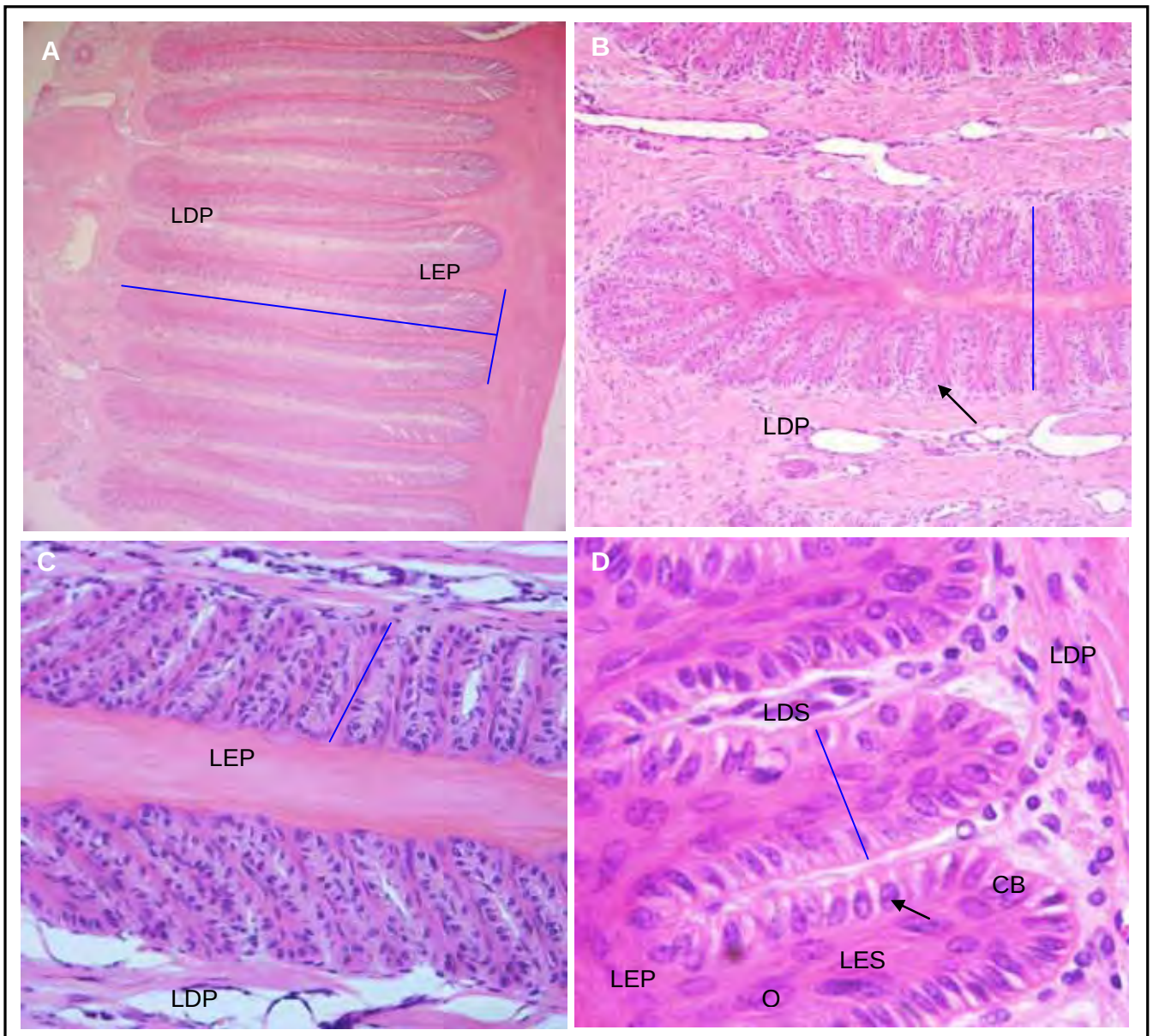


Figura 3 – Fotomicrografias – Em A - Aspecto histológico das lâminas epidérmicas do casco de eqüinos do Grupo Controle, onde se visualiza a queratinização das LEP e o contorno regular das LES. A linha

azul indica o comprimento e a largura da LEP e a marcação utilizada para sua determinação (HE - obj. 4x). Em B observa-se o aspecto histológico das lâminas epidérmicas do casco de eqüinos do Grupo Controle (GI), ilustrando a queratinização das LEP e o contorno regular das LES, LES paralelas entre si com seus ápices arredondados (setas), largura das LEP (linha azul) (HE - obj. 20x). Em C e D observa-se o aspecto histológico das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de eqüinos do Grupo Controle, visualizando-se a diferença de comprimento e largura (linha azul) entre as LES e as LDS, o formato em bastão das LES, a presença de queratinócitos (Q) nas LES e os núcleos basais de formato oval dispostos no ápice das células basais (CB) (seta) (Figura C - HE - obj. 40x) (Figura D - HE - obj. 60 x).

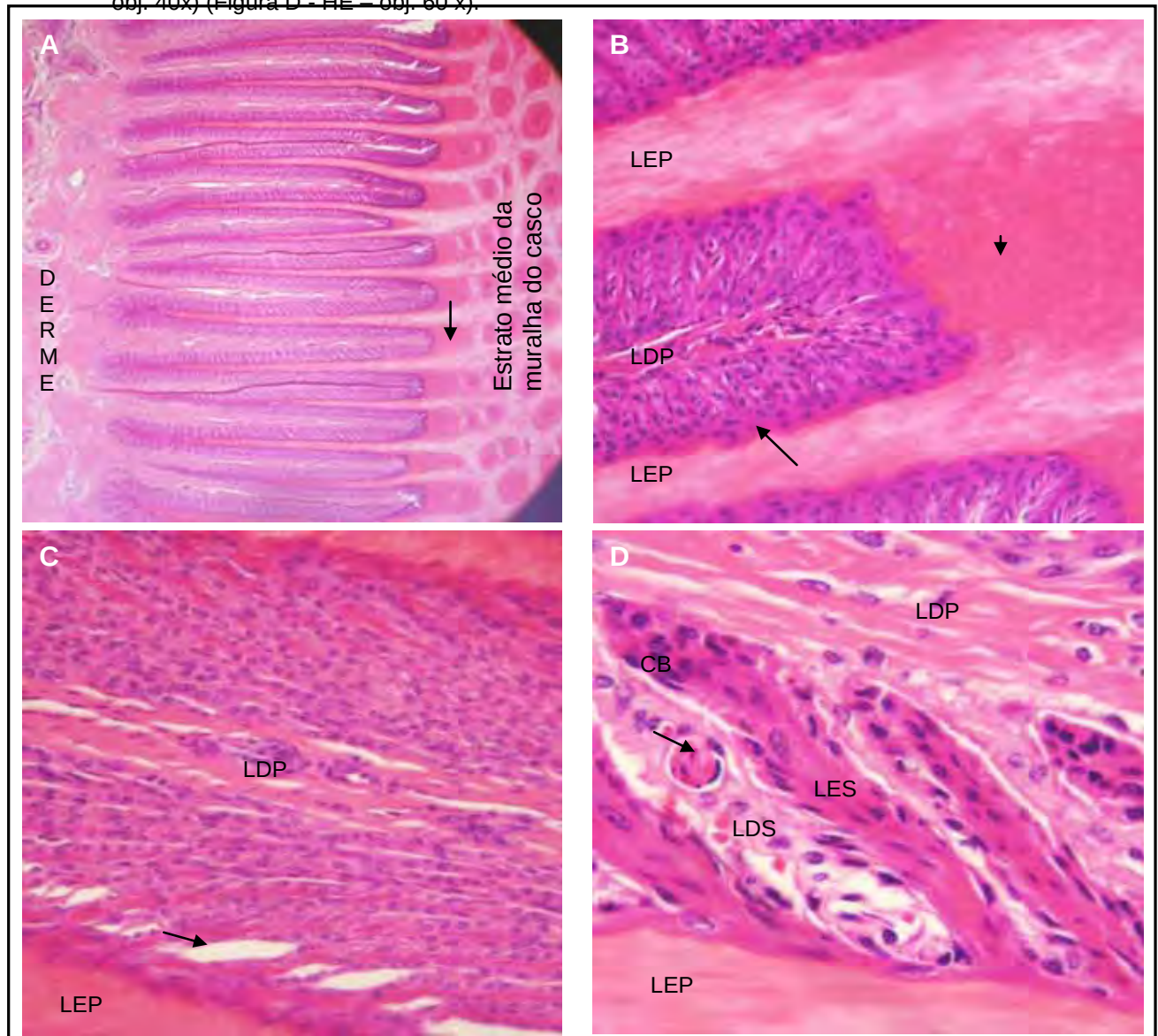


Figura 4 – Fotomicrografias dos eqüinos dos Grupos Laminite e Laminite+Trinitroglicerina. Em A ilustra-se aparente retração com queratinização da base das lâminas epidérmicas primárias nos eqüinos do Grupo Laminite (seta) (HE – obj. 4x). Em B, imagem do Grupo Laminite+Trinitroglicerina com células em fase de queratinização (seta), aparente retração da lâmina epidérmica primária (LEP) devido à queratinização avançada das células basais na base da LEP (cabeça de seta) (HE - obj.

20x). Em C, espaços vazios entre a lâmina epidérmica primária (LEP) e a lâmina dérmica primária (LDP), indicativo de retração e lesões lamelares (seta) (HE – obj. 40x). Em D, perda de arquitetura das lâminas epidérmicas secundárias (LES), células basais (CB) com os núcleos arredondados ou de forma irregular, presença de material amorfo constituído aparentemente de fibrina, hemácias e leucócitos aderidos ao endotélio vascular (seta) na LDS (HE – obj. 100x).

Relativamente ao comprimento da LEP, observaram-se diferenças entre os membros torácicos e pélvicos como entre os Grupos Controle, Laminite e Laminite + Trinitroglicerina. O maior comprimento médio dos membros torácicos foi observado nos eqüinos do Grupo Controle (3231 μ m), com valores sucessivamente menores nos grupos Laminite (3051 μ m) e Laminite + Trinitroglicerina (2160 μ m). O mesmo ocorreu com os membros pélvicos, nos quais o maior valor do comprimento das LEP foi obtido nos eqüinos do Grupo Controle, com valores intermediários do Grupo Laminite e menores no Grupo Laminite + Trinitroglicerina (Tabela 1).

Quanto à largura das LEP, não se observaram diferenças entre os membros torácicos e pélvicos nos eqüinos do Grupo Controle, embora nos demais grupos esta variável tenha diferido de tamanho entre membros torácicos e pélvicos. Ao se comparar a largura das LEP dos membros torácicos dos eqüinos do Grupo Controle com os eqüinos dos demais grupos, observou-se que os cavalos do Grupo Laminite + Trinitroglicerina apresentaram os menores valores (215 μ m $\pm$ 1,94), enquanto os tamanhos dos outros dois grupos não diferiram entre si, sendo de 253 μ m $\pm$ 1,88 e 264 μ m $\pm$ 4,25 para os Grupos Controle e Laminite, respectivamente. Ao considerar a largura da LEP dos membros pélvicos observou-se que ocorreram diferenças entre os três grupos (Tabela 1).

Ao avaliar-se o comprimento das LES dos membros torácicos e pélvicos dos eqüinos do Grupo Controle observou-se que estas não diferiram. Entretanto, nos grupos induzidos com carboidrato, Grupo Laminite e Grupo Laminite + Trinitroglicerina, ocorreram diferenças marcantes entre os membros torácicos e pélvicos. O comprimento das LES dos membros torácicos nos dois grupos induzidos teve aumento significativo quando comparado com o Grupo Controle, porém, notou-se que não houve diferença entre os grupos induzidos. A mesma ocorrência se deu em relação ao comprimento da LES do membro pélvico, as quais não diferiram entre os animais dos

Grupos Laminite e Laminite+Trinitroglicerina, no entanto, foram maiores que as registradas no Grupo Controle.

Os dois grupos induzidos tiveram redução na largura das LES, porém, o Grupo Laminite + Trinitroglicerina foi o que obteve a maior redução. Novamente foi observado que as lâminas epidérmicas secundárias apresentaram diferenças entre os membros torácicos e pélvicos, sendo que a largura dessas lâminas era maior nos membros torácicos nos três grupos estudados (Tabela 1).

Tabela 1 – Média $\pm$ EPM do comprimento e largura das lâminas epidérmicas dos membros torácicos e membros pélvicos dos Grupos Controle, Laminite e Laminite + Trinitroglicerina.

Variáveis		GRUPOS					
		Controle		Laminite		Laminite + Trinitroglicerina	
		MT	MP	MT	MP	MT	MP
LEP	Comprimento (μm)	3231 $\pm$ 16,38 ^{Aa}	2699 $\pm$ 15,35 ^{B1}	3051 $\pm$ 22,76 ^{Ab}	2598 $\pm$ 22,07 ^{B2}	2160 $\pm$ 51,72 ^{Ac}	1865 $\pm$ 43,11 ^{B3}
	Largura (μm)	253 $\pm$ 1,88 ^{Aa}	246 $\pm$ 2,03 ^{A1}	264 $\pm$ 4,25 ^{Ba}	287 $\pm$ 8,42 ^{A2}	215 $\pm$ 1,94 ^{Bb}	229 $\pm$ 1,77 ^{A3}
LES	Comprimento (μm)	141 $\pm$ 2,21 ^{Aa}	136 $\pm$ 2,42 ^{A1}	201 $\pm$ 4,67 ^{Ab}	190 $\pm$ 4,05 ^{B2}	196 $\pm$ 4,48 ^{Ab}	187 $\pm$ 2,71 ^{B2}
	Largura (μm)	31 $\pm$ 0,36 ^{Aa}	28 $\pm$ 0,26 ^{B1}	29 $\pm$ 0,53 ^{Ab}	26 $\pm$ 0,44 ^{B2}	24 $\pm$ 0,31 ^{Ac}	22 $\pm$ 0,33 ^{B3}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si para MP e MT no mesmo grupo.

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si para MT entre os grupos.

Médias seguidas de números iguais na mesma linha não diferem entre si para MP entre os grupos.

IV. DISCUSSÃO

Os membros da família Equidae são mamíferos que representam o resultado da evolução extrema dos digitígrados. Os únicos dígitos, encerrados em resistentes cascos queratinizados, na extremidade dos membros relativamente leves, têm indubitavelmente, contribuído com a velocidade e a versatilidade dos animais desta espécie. Porém há um preço. Imobilidade e incapacitação é o resultado se a conexão entre o casco e a terceira falange falhar. Entre os eqúídeos selvagens, deve existir seleção natural referente a tal falha no casco (conhecida como laminite) uma vez que os acometidos por esta afecção estariam impossibilitados de caminhar normalmente, especialmente empreender fugas o que atrairia rapidamente a atenção dos predadores. Os eqüinos são normalmente móveis e atléticos, porém, quando desenvolvem laminite se tornam debilitados, lentos e dependentes (POLLITT, 2007).

Nesta pesquisa atribuiu-se às diferenças anatômicas observadas no comprimento das lâminas epidérmicas primárias e a largura das secundárias nos cascos dos dígitos torácicos de eqüinos saudáveis, de 16,5% e 9,7% maiores, respectivamente, do que nos cascos dos membros pélvicos, a maior carga que os membros torácicos estão submetidos tanto em repouso, suportando 60% do peso total do eqüino, quanto em movimento, podendo receber pressões três vezes maiores que seu peso total em apenas um membro. Portanto quanto maior a área de contato maior será a fixação e aderência entre o casco e a falange distal. É imprescindível, que as estruturas estejam em perfeito estado para que a parede do casco garanta a sustentação da parede da falange distal.

A parede do casco eqüino age como componente importante do sistema ósseo. Durante a locomoção, a parede do casco está sujeita à cargas repetidas elevadas e às interações de conectividade. Em um cavalo da raça puro-sangue inglês, por exemplo, a

força vertical agindo em cada dedo durante o galope é igual ou maior do que o peso do animal, multiplicada pela aceleração, o que gera uma força de aproximadamente 9000 N. Obviamente, a ação desta carga sobre o casco ocorre a cada galão em ínfimo momento de apoio de duração, muitas vezes menor, que um segundo (GEARY, 1975). Esta carga é transmitida à terra pela superfície de contato palmar ou plantar da parede do casco, o qual tem uma área total de aproximadamente 20 cm². Assim, se a carga for distribuída uniformemente sobre esta área, o material da parede do casco experimenta um estresse da ordem de 14,3 kg/cm² (WAINWRIGHT et al., 1982).

Neste estudo, a diminuição no comprimento e o aumento na largura das LEP, assim como alongamento e estreitamento das LES, alterações na morfologia das células basais, e sinais de separação da membrana basal das células basais foram associados com a laminite aguda induzida por sobrecarga de carboidrato em eqüinos tratados ou não com trinitroglicerina, quando comparado com indivíduos saudáveis.

A literatura da laminite eqüina contém diferentes opiniões sobre a patogênese das lesões ocorridas nos cascos. Algumas pesquisas concernem às alterações hemodinâmicas profundas no fluxo sangüíneo do casco. Segundo observações efetuadas por COFFMAN et al. (1970) e ROBINSON et al. (1976) em estudos angiográficos realizados para examinar o diâmetro e a distribuição do suprimento vascular dentro do casco em eqüinos normais e com laminite, ocorre aumento no diâmetro dos grandes vasos e diminuição no diâmetro dos vasos terminais do casco durante a fase aguda da laminite, os quais, segundo estes autores, eram consistentes com vasoconstrição. Pesquisas conduzidas por ACKERMAN et al. (1975) e RUCKER et al. (2006), por meio de venogramas na circulação distal dos membros, sugeriram redução na perfusão vascular terminal do casco após a indução de laminite com sobrecarga de carboidratos em eqüino. Por sua vez em 1978, HOOD et al. por meio da administração intra-arterial de moléculas radioativas de albumina demonstraram que a redução na perfusão capilar na região laminar ocorria devido à abertura das anastomoses arteriovenosas, na altura do plexo coronário, durante o início da claudicação.

Estudos hemodinâmicos conduzidos por ALLEN et al. (1990) e EATON et al. (1995), em eqüinos com laminite induzida experimentalmente, indicaram diferenças entre as resistências vasculares dos segmentos pré e pós-capilar, sugerindo a ocorrência de aumento na resistência vascular no lado venoso do leito capilar laminar no estágio prodrômico da laminite. Tais achados forneceram suporte adicional à hipótese de que o aumento do tônus venomotor inicia a laminite.

Por sua vez, ALLEN et al. (1990) e HUNT (1991) estabeleceram que a abertura de anastomoses arteriovenosas na banda coronária favorecia a redução do fluxo sangüíneo. HOOD et al. (2001), utilizando o modelo de sobrecarga CHO verificaram diminuições na temperatura superficial da muralha do casco oito a 12 horas antes do início da claudicação. Os autores concluíram que estes achados indicavam redução de perfusão laminar e da atividade metabólica.

Em estudo recente, POLLITT & DAVIES (1998) contestaram essas teorias, ao afirmarem que na fase prodrômica da laminite ocorre vasodilatação e não vasoconstrição. Estes autores constataram aumentos na temperatura do casco na fase de desenvolvimento da lesão, correlacionando esses achados com a ocorrência de vasodilatação do dígito. Coincidentemente, ROBINSON et al. (1976) e TROUT et al. (1990) também já haviam afirmado que a laminite é precedida por aumento de fluxo de sangue na região laminar.

Além disto, POLLITT & DAVIES (1998) relataram que a perfusão diminuída do leito capilar dos cascos de eqüinos com laminite aguda induzida, atribuída pelos outros pesquisadores a venoconstrição era, provavelmente, o resultado de lesões lamelares, estas lesões nas lâminas dérmicas secundárias seriam as responsáveis pelos danos aos capilares, causando colabamento ou mesmo rupturas dos mesmos, não sendo a venoconstrição a causa da laminite.

No presente trabalho ocorreu, nos dois grupos induzidos, retração das LEP com maior queratinização de sua base, esta retração foi atribuída à queratinização precoce das células basais, sendo maior no grupo Laminite + Trinitroglicerina.

Especulou-se, que a redução das LEP no Grupo Laminite ocorreu pela produção acelerada de queratina pelos queratinócitos (células basais - CB) que tiveram seu

contato com a membrana basal (MB) rompido por metaloproteinases (MMP), ocorrendo assim, a morte celular ou, ainda, à tentativa do organismo de promover rápida recuperação tecidual, porém pelo fato dos vasos estarem lesionados e a presença de MMP promover a separação das CB da MB as primeiras não foram suficientemente providas de nutrientes, acarretando, deste modo a morte celular e maior queratinização no local.

Segundo COFFMAN et al. (1970), a estrutura e qualidade do tecido córneo são dependentes da queratinização fisiológica na qual o produto final, o tecido córneo do casco, pode não ser de boa qualidade. As células epidérmicas ou queratinócitos se tornam queratinizadas, em processo que tem sido descrito como morte programada. E devido à epiderme ser avascular, os queratinócitos dependem para sua nutrição da difusão de oxigênio e nutrientes da microcirculação da derme ("corium"), através da MB, sendo que esta difusão é facilmente quebrada e quando isto ocorre, o resultado é a produção de tecido córneo com alterações estruturais.

Neste trabalho foi hipotetizado que as alterações morfológicas encontradas no grupo Laminite + Trinitroglicerina se deviam ao fato da trinitroglicerina provocar vasodilatação das anastomoses, possibilitando o aporte de maior quantidade de citocinas aos vasos da derme laminar, essas citocinas ativariam metaloproteinases em grandes quantidades, causando assim, morte celular e, conseqüentemente, maior queratinização. O uso da trinitroglicerina ocasionou redução de 33% no comprimento das LEP nos membros torácicos e de 31% nos membros pélvicos quando comparados com os membros torácicos e os membros pélvicos do grupo controle e de 29% nos membros torácicos e de 28% nos membros pélvicos quando comparados com o grupo Laminite. Sendo que o grupo Laminite teve redução no comprimento das LEP de 5,6% para os membros torácicos e de 3,8% para os membros pélvicos quando comparados com o grupo Controle, estabelecendo diferença de 15% entre os membros torácicos e pélvicos do mesmo grupo.

Segundo POLLITT & MOLYNEUX (1987) existem, em cada um dos cascos dos eqüinos, aproximadamente 500 anastomoses arteriovenosas (AVAS) por cm², valor significativamente alto em relação às outras espécies de mamíferos. MOLYNEUX et al.

(1994) relataram que a abertura dessas AVAS poderia ser ativada em cavalos com laminite por peptídeos vasoativos provenientes de órgãos doentes distantes dos cascos, promovendo dilatação inadequadas das AVAS e contribuindo para a isquemia laminar e conseqüentemente, laminite aguda. Essa vasodilatação que ocorreria nas AVAS seria causada pela produção de NO a partir da NO sintetase constitutiva presente nas células endoteliais (FURCHGOTT, 1981) ou ainda, pela ativação de macrófagos capazes de promover a produção de NO a partir do NO sintetase induzida (HAMMOND et al., 1999).

Segundo BAILEY et al. (2004) as aminas produzidas por bactérias no ceco de eqüinos e liberadas na circulação após sobrecarga de carboidratos, contribuiriam com a vasoconstrição digital. A ação dessas aminas é seletiva a vasculatura digital sobre a circulação sistêmica, e o seu efeito é mediado direta ou indiretamente via deslocamento da 5-Hidroxitriptamina (5-HT) pelas plaquetas. MENZIES-COW et al. (2004), corroboraram com este pesquisadores, ao concluírem que a hipoperfusão digital coincide com o aumento significativo de mediadores vasoativos derivados de plaquetas, tromboxane A² (TXA²) e 5-HT.

Com o intuito de restabelecer a circulação no dígito eqüino causada por substâncias vasoconstritoras, HINCKLEY et al. (1996) utilizaram precursores de ON, conhecido vasodilatador, relatando sua eficácia no tratamento de laminite em pôneis.

EADES et al. (2006), posteriormente, utilizando a nitroglicerina, comprovaram melhora significativa na resistência do fluxo sanguíneo total, porém esses pesquisadores não verificaram alteração na resistência pós-capilar na perfusão de dígitos isolados de eqüinos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos, e a combinação da nitroglicerina com antagonista de receptores de endotelina causou diminuição na resistência pré e pós-capilar e no fluxo sanguíneo digital, deixando seus valores próximos ao normal. No entanto, GILHOLLY et al. (2005) ao utilizarem sachês de trinitroglicerina com o intuito de diminuir o tônus vasomotor, não verificaram alterações plasmáticas significativas na concentração de óxido nítrico no fluxo sanguíneo digital arterial e venoso, indicando que esta não foi absorvida pela pele. RAGLE (1999) relatou que o sucesso obtido com o uso da nitroglicerina deu-se em

caso de laminite causada por frutana, uma oligofrutose presente em gramíneas, os quais podem apresentar melhora clínica espontaneamente, não sendo, entretanto, tão eficientes em casos induzidos por sobrecarga de carboidratos.

Averigou-se no presente estudo que as lâminas dérmicas secundárias estavam retraídas ou lesionadas, acarretando prejuízo vascular ou mesmo a ausência de capilares próximos às lâminas epidérmicas secundárias, restando somente os grandes vasos presente na derme subjacente. Devido a esses achados hipotetizou-se que a retração da derme causaria colapso dos vasos ou mesmo a destruição destes, sendo estas lesões as responsáveis pela ausência de circulação periférica impedindo, assim, a chegada de aporte sanguíneo até as LES, contrariando COFFMAN et al. (1970) e ROBINSON et al. (1976) que co-relacionaram a ausência de circulação periférica presentes nas venografias com a vasoconstrição, causadora da laminite.

Segundo LINFORD (1987) a laminite induzida pela sobrecarga de carboidratos causa estiramento e deformação da lâmina epidérmica enquanto aumenta a severidade da claudicação. Alguns pesquisadores relataram que ocorrem distorções anatômicas das lâminas apenas oito horas após a claudicação. Há adelgaçamento e afunilamento das estruturas lamelares acompanhadas por redução, achatamento e deslocamento das camadas epiteliais (OBEL, 1948; MOSTAFA, 1986; POLLITT, 1996).

As LEP do grupo Laminite tiveram aumento na sua largura, o que foi atribuído ao aumento no comprimento das LES, que ao ficarem mais compridas alargaram as LEP.

As LES foram vistas mais compridas tanto no grupo Laminite como no grupo Laminite + Trinitroglicerina quando comparados ao grupo Controle, pressupõe-se que este aumento foi ocasionado pela ruptura da ligação da célula basal com a MB em alguns pontos fazendo com que esta célula deixasse de ser nutrida por difusão através da MB, com isto ocorrendo ruptura entre as células basais, causando, assim, perda da arquitetura lamelar. As CB quando sofrem o processo de queratinização se deslocam para o eixo queratinizado da LEP. Porém em alguns pontos ainda estão presas a falange distal por miofilamentos fazendo com que as LES fiquem estiradas.

As CB estão ligadas por hemidesmossomos que se conectam com os filamentos de ancoragem na MB, destes filamentos projetam-se fibrilas em direção a falange distal,

que a penetram fixando à falange distal a muralha do casco (POLLITT & MOLYNEUX, 1987).

A administração de trinitroglicerina ao Grupo Laminite + Trinitroglicerina não preveniu ou atenuou as degenerações laminares observadas, as quais foram mais graves do que as notadas no Grupo Laminite. Este fato evidencia que outros fenômenos além das alterações vasculares e, conseqüentemente, vasoconstrição, podem estar relacionados à patogenia da afecção.

V. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitiram-nos concluir que:

- A administração de trinitroglicerina, nas doses preconizadas neste trabalho, não foi capaz de impedir a forma aguda da laminite nem tampouco as alterações degenerativas do tecido dérmico e epidérmico do casco de eqüinos laminíticos, detectadas através das análises morfológicas e morfométricas;
- As alterações histológicas observadas poucas horas após o desenvolvimento da fase aguda, permitem-nos inferir que qualquer terapia utilizada na laminite deverá ser empregada antes da ocorrência de claudicação;
- Estudos adicionais devem ser realizados na tentativa de elucidar, com maior exatidão, as causas desta enfermidade, pois enquanto não se conhecer completamente os mecanismos envolvidos na sua fisiopatogenia, será extremamente difícil preconizar-se uma terapia efetiva.

VI. REFERÊNCIAS⁴

- ACKERMAN, N., GARNER, H.E., COFFMAN, J.R., et al. Angiographic appearance of the normal equine foot and alterations in chronic laminitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 166, n.1, p.58-62, 1975.
- ALLEN D., JR., CLARK E.S., MOORE J.N., et al. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p.1930-1934, 1990.
- BAILEY, S.R., MARR, C.M., ELLIOTT, J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horses. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 129-142, 2004.
- BAXTER, G. M. Diagnosing and treatment of acute laminitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. outubro, p. 940-952, 1996.
- BRYANT, C.E., ELLIOTT, J. Nitric oxide: a friend or foe? **Equine Veterinary Education**. v.6, n.2, p.59-64, 1994.
- BURCH, G.E., HARB J.M, SUN C.S. Fine structure of digital vascular lesions in Raynaud's phenomenon and disease. **Angiology**, v.30, p. 361-376, 1979.
- COFFMAN, J.R; JOHNSON J.H., FINOCCHIO E.J., GUFFY M.M. Biomechanics of pedal rotation in equine laminitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, p.219-221, 1970.
- EADES, S.C., STOKES, A.M., MOORE, R.M. Effects of an endothelin receptor antagonist and nitroglycerin on digital vascular function in horses during the prodromal stages of carbohydrate overload-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, n.7, p.1204-1211, 2006.

⁴ De acordo com a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) – N.B.R. – 6023 Ago/2002.

- EATON, S.A., ALLEN, D., EADES, S.C., et al. Digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis induced by an aqueous extract of black walnut (*Juglans nigra*) in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p.1338-1344, 1995.
- EKFALCK, A., RODRIGUEZ, H., OBEL, N. Histopathology in post-surgical laminitis with a peracute course in a horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, p.321-324, 1992.
- FURCHGOTT, R.F. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. **Trends Pharmaceut Sci** v.7, p. 173-176, 1981.
- GARNER, H.E., COFFMAN, J.R., HAHN, A.W., et al. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.4, p.441-444, 1975.
- GEARY, J.E. JR. The dynamics of the equine foreleg. MMAE thesis, University of Delaware, 1975.
- GILHOOLY, M.H., EADES, S.C., STOKES, A.M., MOORE, R.M. Effects of Topical Nitroglycerine Patches and Ointment on Digital Venous Plasma Nitric Oxide Concentrations and Digital Blood Flow in Healthy Conscious Horses **Veterinary Surgery**, v. 34, n.6, p.604–609, 2005.
- HAMMOND, R.A., HANNON, R., FREAN, S.P., ARMSTRONG, S.J., FLOWER, R.J., BRYANT, C.E. Endotoxin induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in equine alveolar macrophages. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.4, p.426-431, 1999.
- HINCKLEY, K.A., FEARN, S., HOWARD, B.R., et al. Nitric oxide donors as treatment for grass induced acute laminitis in ponies. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p.17-28, 1996.
- HOOD, D.M., AMOSS, M.S., HIGHTOWER, D. Equine laminitis I: Radioisotopic analysis of the hemodynamics of the foot during the acute disease. **Journal Equine Medical Surgery**, v.2, p.439, 1978.
- HOOD, D.M., WAGNER, I.P., BRUMBAUGH, G.W. Evaluation of hoof wall surface temperature as an index of digital vascular perfusion during the prodromal and acute

- phases of carbohydrate-induced laminitis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.1167-1172, 2001.
- HUNT, R.J. The pathophysiology of acute laminitis. **Compendium Continuing Education Practice Veterinary**, v.13, p. 401-407, 1991.
- JORIS, I., MAJNO, G. Endothelial changes induced by arterial spasm. **American Journal of Pathology**, v.102, p.346-358, 1981.
- LARSSON, B., OBEL, N., ABERG, B. On the biochemistry of keratinization in the matrix of the horse's hoof in normal conditions and in laminitis. **Nordisk Veterinaer medicin**, V.8, p.761-776, 1956.
- LINFORD, R.L. A radiographic, morphometric, histological and ultrastructural radiographic findings for sound and foot sore thoroughbreds and horses with experimentally induced traumatic and alimentary laminitis. 1987. Thesis (PhD) – University of California, Davis, 1987.
- MENZIES-GOW, N.J., BAILEY, S.R., KATZ, L.M., et al. Endotoxin-induced digital vasoconstriction in horses: associated changes in plasma concentrations of vasoconstrictor mediators. **Equine Veterinary Journal**, v.36, p.273-278, 2004.
- MOLYNEUX, G.S., HALLER, C.J., MOGG, K., et al. The structure, innervation and location of arteriovenous anastomoses in the equine foot. **Equine Veterinary Journal**, v.26, p.305-312, 1994.
- MOSTAFA, M.B. Studies on experimental laminitis in horse. Tese. Universidade do Cairo, College of Veterinary Medicine. 1986.
- OBEL, N. Studies on the histopathology of acute laminitis. **Almquist and Wiksells**. Uppsala, Suécia. 1948.
- POLLITT, C.C. AND MOLYNEUX, G.S. (1987) An electron microscopic study of the laminar dermal microcirculation of the equine foot I. Scanning electron microscopy. In: **Progress in Microcirculation**. Eds: M. A. Perry and D. G. Garlick. The University of New South Wales, Kensington, Australia. P 23.
- POLLITT, Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.28, n.1, p.38-46, 1996.

- POLLITT, C.C., DAVIES, C.T. Equine laminitis: its development coincides with increased sublamellar blood flow. **Equine Veterinary Journal**, v.26, p.125-132, 1998 (Suplemento).
- POLLITT, C.C. Microanatomy of the hoof wall. Visto em <<http://www.uq.edu.au/~apcpolli/>> Acessado em 20 de setembro de 2007.
- RAGLE, C.A. Nitroglycerin treatment of equine laminitis. **Compendium on Continuing Educacion for the Practicing Veterinarian**, 21:2, 170-174, 1999.
- ROBERTS, E.D., OCHOA, R., HAYNES, P.F. Correlation of dermal-epidermal laminar lesions of equine hoof with various disease conditions. **Veterinary Pathology**, v.17, p.656-666, 1980.
- ROBINSON, N.E., SCOTT, J.B., DABNEY, J.M., et al. Digital vascular responses and permeability in equine alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p.1171-1174, 1976.
- RUCKER, A., REDDEN, R.F., ARTHUR, E.G., REED, S.K., HILL, B.W., DZIUBAN, E.M., RENFRO, D.C. How to perform the digital venogram. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 52, p. 526-529, 2006.
- STUMP, J.E. Anatomy of the normal equine foot, including microscopic features of the laminar region. **Symposium on the Equine Foot**. v.15, p.1588-1599, 1967
- TOMLINSON, D.J., MÜLLING C.H., FAKLER T.M. *Invited Review: Formation of Keratins in the Bovine Claw: Roles of Hormones, Minerals, and Vitamins in Functional Claw Integrity*. Visto em <http://jds.fass.org/cgi/content/full/87/4/797>. Acessado em 20 de julho de 2007.
- TROUT, D.R.; HORNOF, W.J.; LINFORD, R.L. et al. Scintigrafic evaluation of digital circulation during the developmental and acute phases of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 6, p. 416-421, 1990.
- WEISS, D.J., Equine laminitis; a review of recent research. **Equine Practice** v.19, n. 1, p. 16-20, 1997.
- WAINWRIGHT, S.A., BIGGS, W.D., CURREY, J.D. AND GOSLINE, J.M. (1982). *Mechanical Design in Organisms*. Princeton: Princeton University Press.

YELLE, M. Clinicians guide to equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.18, n.2, p.156-158, 1986.

CAPÍTULO 3: LAMINITE EQÜINA EXPERIMENTAL: ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL E MORFOMÉTRICO DAS LÂMINAS DÉRMICAS E EPIDÉRMICAS DO CASCO TRATADOS COM TRINITROGLICERINA

RESUMO - A gravidade da laminite tem suscitado a realização de inúmeras pesquisas de caráter clínico, morfológico e farmacológico, entre outros, na tentativa de elucidar as causas do processo, para o qual se buscam tratamentos eficientes. Os precursores de óxido nítrico têm sido indicados no tratamento da laminite. Neste trabalho avaliou-se ultra-estruturalmente o efeito da trinitroglicerina, um precursor do óxido nítrico, na prevenção da laminite aguda em eqüinos. Foram utilizadas amostras do casco de quinze eqüinos adultos. Os animais foram distribuídos em três grupos: Controle, Laminite e Laminite + Trinitroglicerina, constituídos cada um de cinco animais. Para as análises ultra-estruturais foram selecionadas as interfaces entre as lâminas epidérmicas e dérmicas dos cascos de eqüinos desses grupos. A indução da laminite por meio da sobrecarga de carboidratos diminuiu significativamente as áreas da célula e do núcleo dos dois grupos induzidos (Grupo Laminite e Grupo Laminite + Trinitroglicerina), em comparação com o Grupo Controle. A análise estatística mostrou que o Grupo II foi o que obteve maior redução dessas áreas, porém a porcentagem de ocupação do núcleo na célula não diferiu nos dois grupos induzidos. No presente estudo observou-se que o grupo Laminite + Trinitroglicerina não diferiu morfometricamente do grupo Laminite, ou seja, as degenerações celulares observadas foram da mesma natureza, porém ocorreram diferenças entre grupos quanto às áreas das células e dos núcleos, de menor intensidade no grupo Laminite + Trinitroglicerina. Nos locais aonde a membrana basal se encontrava desprendida da epiderme não foram encontrados hemidesmossomos íntegros; estes permaneciam aderidos às células basais ou aos restos de membrana celular. Provavelmente esta separação se deve ao rompimento primário das fibras de ancoragem. Com base nos achados da presente pesquisa constatou-se que na laminite ocorrem alterações precoces nas fibras de ancoragem e que a utilização do óxido nítrico não previne o desenvolvimento desta afecção.

I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Nenhum outro ungulado é acometido tão severamente por degeneração das lâminas dos cascos como os eqüinos. A gravidade das lesões dérmicas e epidérmicas do casco tem suscitado o desenvolvimento de inúmeras pesquisas de caráter clínico, morfológico e farmacológico, entre outros, na tentativa de elucidar as causas do processo. Certamente, a laminite é uma das afecções mais freqüentemente pesquisadas em medicina veterinária.

As pesquisas sobre as causas e sobre a terapia da laminite têm avançado nos últimos anos e contribuído significativamente para os progressos obtidos nos tratamentos não apenas desta, mas também de outras afecções, não menos importantes, como a endotoxemia. Resultados promissores foram alcançados nos últimos anos, particularmente quanto ao uso terapêutico de substâncias vasodilatadoras.

Substâncias vasoconstritoras como a prostaglandina já foram consideradas potencialmente responsáveis pelo desenvolvimento da laminite (MOORE et al., 1989). Estudos conduzidos por BAILEY & ELLIOTT (1998) sugeriram que a 5-Hidroxitriptamina (5-HT), um mediador vasoativo, formado a partir do triptofano da dieta, pelas células enterocromafins do intestino, pode provocar constrição parcial dos vasos digitais.

Recentemente quantidade considerável de compostos monoaminas, tais como: tiramina, triptamina e feniltilamina, foram descritos no conteúdo cecal de eqüinos (BAILEY et al., 2002 e 2004). Alguns desses compostos são estruturalmente similares aos vasoconstritores endógenos, como o 5-HT e catecolaminas (epinefrina, norepinefrina e dopamina), e são potentes vasoconstritores de veias e artérias digitais isoladas “in vitro” (ELLIOTT et al., 2003), tendo sua produção aumentada quando o conteúdo cecal é incubado “in vitro” com fontes de carboidratos (BAILEY et al., 2002). A utilização de precursores de óxido nítrico (NO), denominados nitrovasodilatadores, tem apresentado resultados clínicos promissores (BRYANT & ELLIOTT, 1994).

PERONI et al. (2006) analisaram a resposta a receptores agonistas alfa-adrenérgicos, 5-HT, prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), e endotelina -1 (ET-1) e observaram uma predisposição a venoconstrição nas lâminas dérmicas eqüina.

EADES et al. (2007) em estudos de alterações hemodinâmicas de cavalos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos verificaram que a ET-1 de cavalos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos está aumentada no sangue venoso digital e jugular, porém não observaram redução na concentração de óxido nítrico (NO) no sangue venoso digital.

Os nitrovasodilatadores mostraram-se reguladores do fluxo e pressão sanguínea de vários órgãos. Relaxam a maioria dos músculos lisos, incluindo o das artérias e veias. Dois desses medicamentos têm sido utilizados farmacologicamente, o trinitrato de gliceril (TNG), também conhecido por trinitroglicerina, e o nitroprussiato de sódio (NPS). Baixas concentrações de trinitroglicerina produzem dilatação das vênulas que predomina sobre a das arteríolas. A aparente seletividade de alguns nitrovasodilatadores para diferentes leitos vasculares pode estar relacionada à sua biodisponibilidade e ao metabolismo celular diferencial dos fármacos em NO. O óxido nítrico é considerado o intermediário ativo na ação desta ampla classe de fármacos (MURAD, 1986).

Estudos recentes discutem a função do NO na regulação do fluxo sangüíneo na laminite (HINCKLEY et al., 1996; HOFF et al., 2002). O NO é continuamente produzido dentro das células endoteliais pela ação da enzima óxido nítrico sintetase que converte

a *L*-arginina a óxido nítrico e *L*-citrulina. O óxido nítrico se difunde para os músculos lisos adjacentes e estimula o aumento no GMP cíclico por ativação da guanilato ciclase. Aumentos nas concentrações de GMP cíclico reduzem o tônus dos músculos lisos vasculares. Dessa forma, alterações na produção de óxido nítrico pelas células endoteliais dentro do casco resultariam em vasoconstrição e predisporiam as lâminas a injúrias isquêmicas. Aplicação tópica de trinitroglicerina, um doador de óxido nítrico, na quartela de pôneis acometidos por laminite diminuiu a claudicação (HINCKLEY et al., 1996).

EADES et al. (2006) em estudos realizados para avaliar alterações na função vascular digital de cavalos na fase prodrômica da laminite induzida por sobrecarga de carboidratos e determinar os efeitos de um receptor antagonista da endotelina e da nitroglicerina na disfunção vascular associada à laminite, relataram que a sobrecarga de carboidratos causou diminuição significativa na resistência total em dígitos isolados de cavalos anestesiados. A resistência pós-capilar foi diminuída significativamente depois do tratamento com receptor antagonista do endotélio, mas não se alterou com o tratamento à base de nitroglicerina. BERHANE et al. (2006) em estudos para avaliação da vasodilatação endotélio-dependente na resistência de vasos digitais eqüinos, concluíram que o NO originário do endotélio modula a resposta aos vasoconstritores tais como 5-HT e é provavelmente um dos reguladores do fluxo sanguíneo no leito vascular digital.

HINCKLEY et al. (1996) utilizaram precursores de óxido nítrico no tratamento da fase aguda da laminite, quando os sinais de claudicação já estavam bem definidos, demonstrando a eficiência desse fármaco na redução da claudicação. Desde então, inúmeras discussões foram conduzidas com o intuito de determinar com maior precisão a eficiência dessa medicação. Todavia, até o presente momento esses debates não foram enriquecidos por novas informações. Acredita-se que a ação terapêutica da trinitroglicerina deva-se a seus mecanismos vasodilatadores, corroborando positivamente os argumentos dos defensores da teoria vasoconstritora.

Alterações histopatológicas presentes no dígito distal do cavalo com laminite aguda refletem a ocorrência de três processos: angiopatia, distorção mecânica dos

tecidos dérmicos e epidérmicos e resposta fisiopatológica nos tecidos afetados. Segundo HOOD et al. (1993), desses três processos, a angiopatia precede histologicamente os outros dois.

A histopatologia da laminite eqüina tem sido descrita em vários estágios de seu desenvolvimento (OBEL, 1948; ROBERTS et al., 1980; LINFORD, 1987). As mudanças repentinas nas organelas citoplasmáticas chaves conduziram OBEL (1948) e EKFAŁCK et al. (1992) a concluir que a epiderme lamelar era o local preliminar da lesão na laminite. Os processos patológicos que ocorrem nas estruturas lamelares, nos estágios tanto de desenvolvimento como agudo, mostraram ser muito difícil de estudar devido a complexa anatomia e a localização no interior da parede do casco. A severidade das lesões da epiderme lamelar foi destacada por ROBERTS et al. (1980), os quais as correlacionaram diretamente aos sinais clínicos. Exames de biopsias feitos da parede dorsal do casco de cavalos que desenvolveram laminite induzida por carboidrato permitiram a LINFORD (1987) seqüenciar as deformações sofridas pela epiderme lamelar estabelecendo correlação entre estas e os diferentes graus de severidade da claudicação descrita por OBEL (1948). Na microscopia ótica, secções dos tecidos lamelares corados com hematoxilina eosina (HE), permitiram a estes autores descrever as mudanças que ocorrem nas lâminas epidérmicas primárias e secundárias.

Na interface entre as lâminas epidérmica e dérmica está localizada uma resistente e ininterrupta bainha de tecido conectivo, denominada membrana basal. Esta estrutura chave é a ponte de ligação entre as células basais da epiderme lamelar do casco, de um lado, e o forte tecido conectivo, de outro, especialmente colágeno tipo I. O colágeno tipo I apresenta a mesma constituição do colágeno tendíneo e no caso do casco a sua outra extremidade está fortemente aderida a superfície dorsal da falange distal. Por sua vez, a MB é formada de um único filamento de colágeno tipo IV, recoberto (embainhado) com glicoproteínas, em particular laminina, uma das inúmeras glicoproteínas da MB (LABEL & DICKSON, 2000).

A MB lamelar está ligada à base das células epidérmicas em sítios discretos chamados hemidesmosomos. Os hemidesmosomos lembram pontos de solda nas barras de metal e são discos que servem para manter a bainha da MB firmemente

aderida a todas as células basais da lâmina epidérmica. Os hemidesmossomos são constituídos de várias proteínas que se tornam escuras quando observadas à microscopia eletrônica de transmissão (LABEL & DICKSON, 2000).

Fazendo a ligação entre a placa densa dos hemidesmossomos e a MB propriamente dita (lâmina densa) estão numerosos filamentos de ancoragem. Cada filamento consiste de uma única molécula de glicoproteína, denominada laminina-5 que é exclusiva dos hemidesmossomos. A proteína denominada BP-180 é um dos compostos dos filamentos de ancoragem. Se algum dos filamentos de ancoragem ou os hemidesmossomos são danificados ou desaparecem, a MB se separa da célula basal. Recentemente descobriu-se que a laminina e BP-180 são substratos de enzimas do tecido conectivo, denominada metaloproteinase (LABEL & DICKSON, 2000).

A digestão de MB pela plasmina expõe o colágeno IV do núcleo axial e reduz a rede de cordas a uma rede de finos filamentos (INOUE, 1995).

Recentemente FRENCH & POLLITT (2004) analisaram ultra-estruturalmente por meio da microscopia eletrônica de transmissão os tecidos do casco tendo mostrado lesões na zona da membrana basal (MB), a conexão entre a derme e a epiderme. Segundo estes autores, os elementos a falharem no desenvolvimento da laminite são os hemidesmossomos e os filamentos de ancoragem.

Adicionalmente, a pesar da realização de inúmeros estudos morfológicos sobre esta afecção, poucos foram os trabalhos que se preocuparam em descrever as alterações ultra-estruturais dos componentes celulares e da matriz tecidual que compõem as lâminas secundárias epidérmicas e dérmicas apesar deste local, em particular, ser imputado como foco inicial da lesão degenerativa responsável pela laminite.

Diante destas considerações, ao se delinear esta avaliação, foram arrolados os seguintes objetivos:

Estudar qualitativa e quantitativamente as ultra-estruturas do tecido laminar do casco de eqüinos normais e com laminite e avaliar ultra-estruturalmente a eficiência de substância vasodilatadora na laminite.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizadas amostras do casco de quinze eqüinos adultos, sem raça definida, seis machos e nove fêmeas, com idades variando entre quatro e sete anos. A alimentação diária foi constituída de 2,0 kg de ração concentrada, fornecida uma vez ao dia, além de feno e sal mineral *ad libitum*. A água estava disponível em cochos apropriados colocados nas baias. Estes animais foram, distribuídos em três grupos, constituídos de cinco animais cada:

Grupo Controle: Formado por eqüinos hígidos, que não receberam sobrecarga de carboidrato e que por razões de ordem humanitária ou econômica foram submetidos à eutanásia (Grupo I).

Grupo Laminite: Constituído por eqüinos submetidos a jejum de 12 horas que receberam por meio de sonda nasogástrica, 17,6g de amido/kg de peso vivo (Maizena®)⁵, diluído em solução aquosa 1:1, para indução de laminite. Estes animais não receberam tratamento (Grupo II).

Grupo Laminite + trinitroglicerina: Os animais deste grupo receberam o amido na quantidade e diluição semelhantes ao grupo anterior. Ao completarem 24 horas da administração de sobrecarga de carboidratos as faces palmares dos boletos dos membros torácicos foram tricotomizadas aplicando sobre estas sachês contendo, cada um, 20 mg de trinitroglicerina (Nitradisc®)⁶ os quais foram fixados sobre a pele com esparadrapo, permanecendo no local até completar-se 48 horas após a administração do carboidrato (Grupo III).

Após eutanásia, realizada 48 horas após a administração de carboidratos nos dois grupos, as extremidades distais dos quatro membros foram desarticuladas na

⁵ Maizena® - UNILEVER DO BRASIL

⁶ Nitradisc® 10 mg - SEARLE

altura da articulação metacarpo-falangeana e metatarso-falangeana, para os membros torácicos e pélvicos, respectivamente.

Os cascos foram seccionados com uma serra de fita, de acordo com protocolo descrito por POLLITT (1996). Obteve-se fragmento retangular da muralha interna do casco, com lados medindo 1,0 x 0,5 cm e espessura de 0,1 cm, contendo a interface entre as lâminas dérmicas e epidérmicas.

2.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Para as análises ultra-estruturais foram selecionadas as interfaces entre as lâminas epidérmicas e dérmicas secundárias dos dedos de eqüinos dos grupos Controle (Grupo I), Laminite (Grupo II) e Laminite + Trinitroglicerina (Grupo III), contendo componentes celulares e matriz extracelular.

Os tecidos cortados foram fixados em glutaraldeído a 3% (fixador primário) em 0,1M de Buffer de cacodilato de sódio (pH 7,3) por 24 horas. Posteriormente, retiradas e colocadas em solução tampão em um procedimento que se repetiu por duas vezes seguidas como lavagem para retirar o fixador. Os blocos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio à 1% (fixador secundário) por 3 horas, desidratados com concentrações crescentes de etanol, etanol e acetona (1:1) e finalmente em acetona (100%). O processo de pré-inclusão foi feito com agente desidratante (acetona 100%) mais uma mistura de resina (Araldite 502, Embed 812)⁷ em proporção acetona-resina 2:1 durante uma hora, 1:1 *overnight* e 1:2 por duas horas. O procedimento de inclusão foi feito com mistura de resina, colocados em moldes de silicone e cápsulas de *beem*, que foram à estufa a 60° C por 72 horas para polimerização do araldite. Um pré-corte com navalha de vidro foi realizado com secções finas, para análise do material. Em etapa subsequente secções ultrafinas foram cortadas com navalha de diamante, coradas com citrato de chumbo Reynold's e 50% de acetato de uranila em etanol e visualizados no

⁷ Araldite 502/Embed 812 Kit E.M.S Washington

microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1010. As imagens selecionadas foram armazenadas em computador para análise morfométrica, utilizando-se um sistema de análise de imagem computadorizada (Imagem Pró Plus).

2.3 Morfometria

No estudo morfométrico, foram analisadas as células basais localizadas nas lâminas epidérmicas secundárias (LES) do casco de eqüinos fotografadas por meio do microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1010, com aumento de 5000 x. De cada animal foram escolhidos aleatoriamente 20 campos totalizando 300 amostras, com posterior análise do número de células, foram medidas 481 células, bem como a área e o volume do núcleo e do citoplasma, individualmente, assim como a área e o volume ocupado pelo núcleo no citoplasma celular. As imagens selecionadas foram armazenadas em computador para análise morfométrica, utilizando-se um sistema de análise de imagem computadorizada, o Imagem Pró Plus.

2.4 Análise estatística

Os diferentes parâmetros estudados foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA), Teste de Tukey, com nível de significância de 0,5%, realizado mediante os procedimentos do SAS (Statistical Analysis System).

III. RESULTADOS

3.1 Análise morfométrica.

A indução da laminite mediante sobrecarga de carboidratos diminuiu a área da célula assim como a área do núcleo dos dois grupos induzidos (Grupo Laminite e Grupo Laminite + Trinitroglicerina), em comparação com o Grupo Controle. Foi observado que o Grupo Laminite foi o que obteve maior redução das áreas, tanto da célula como do núcleo, porém a porcentagem de ocupação do núcleo na célula não foi diferente nos dois grupos induzidos (Tab.2 e Fig. 5).

Tabela 2. Áreas médias da célula e do núcleo, assim como a porcentagem que o núcleo ocupa na célula basal das lâminas epidérmicas secundárias dos eqüinos do Grupo Controle, Grupo Laminite e Grupo Laminite + Trinitroglicerina $\pm$ EPM.

Tratamentos	Área da célula (μ^2)	Área do núcleo (μ^2)	Porcentagem ocupada pelo núcleo na célula
Grupo Controle	47,88 $\pm$ 1,75 ^a	26,83 $\pm$ 0,97 ^a	57,61 $\pm$ 1,01 ^a
Grupo Laminite	30,70 $\pm$ 1,90 ^c	14,54 $\pm$ 1,31 ^c	42,35 $\pm$ 1,70 ^b
Grupo Laminite + Trinitroglicerina	37,72 $\pm$ 2,27 ^b	18,60 $\pm$ 1,30 ^b	42,77 $\pm$ 1,31 ^b

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si.

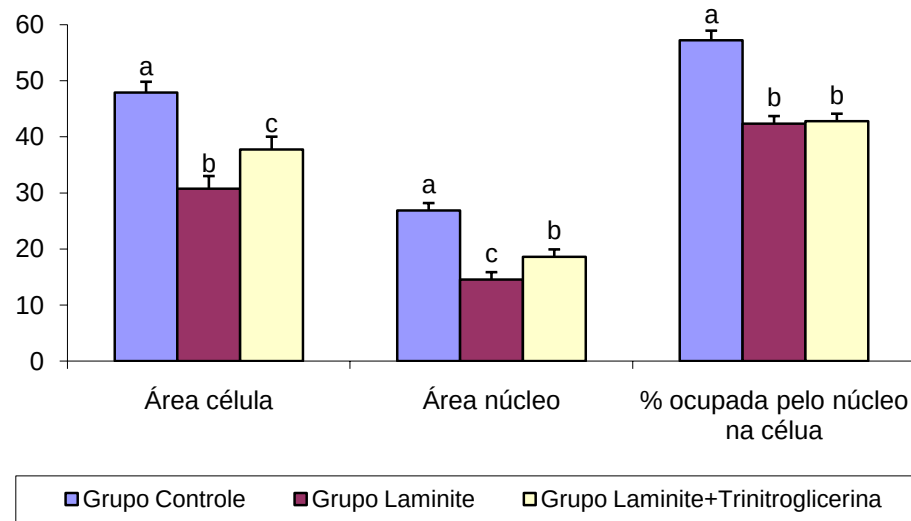


Figura 5. Áreas da célula e do núcleo, assim como a porcentagem ocupada pelo núcleo na célula, nos três grupos de eqüinos estudados: Controle ■, Laminite ■ e Laminite + Trinitroglicerina ■.

3.2 Análise ultra-estrutural do tecido lamelar

3.2.1 Grupo Controle

Por meio de microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar por meio de microscopia de transmissão que as lâminas epidérmicas secundárias são estruturas folhosas dispostas perpendicularmente projetando-se da lâmina epidérmica primária para o interior do casco. Nos espaços entre estas lâminas se interpõe o tecido conectivo das lâminas dérmicas secundárias (Figura 6A).

A porção das lâminas epidérmicas secundárias em contato com o tecido conectivo é composta de células epiteliais dispostas lado a lado e fortemente unidas entre si. Estas células, denominadas basais, formam uma camada unicelular que

reveste integralmente a superfície da lâmina epidérmica secundária. A fileira única de células basais é também reconhecida como a camada germinativa, responsável pela renovação das células da epiderme por meio da intensa atividade mitótica (Figura 6B). Internamente à camada de células basais, na porção central da lâmina epidérmica secundária, podem ser observadas células de limites pouco definidos e núcleo achatado, porém com características muito semelhantes às células basais, imersas na matriz extracelular. As células basais se caracterizam pelo formato cilíndrico e pela presença de um núcleo ovalado disposto no pólo apical. As células basais do epitélio são ancoradas por hemidesmossomos às membranas basais e por desmossomos às células adjacentes, contendo em seu citoplasma filamentos de citoqueratina. À medida que as células vão sendo queratinizadas, a queratina vai sendo acumulada no citoplasma das células. (Figura 6B).

Na interface entre as lâminas epidérmica e dérmica se encontra a estrutura glicoprotéica denominada membrana basal (MB). A MB é por sua vez, constituída de duas lâminas: a basal, com os seus cinco componentes (colágeno tipo IV, laminina, heparansulfato, entactina e fibronectina) e a fibrorreticular, formada de pequenos feixes de fibras reticulares. A lâmina fibrorreticular é constituída de três porções: lâmina lúcida ou rara externa, lâmina densa e lâmina lúcida ou rara interna. As lâminas raras tanto externas como internas apresentam características eletroluscentes, enquanto a lâmina densa, de aspecto mais compacto e escuro se apresenta eletrodensa. Fibrilas de ancoragem tipo VII, presentes na lâmina fibrorreticular, ligam a MB à matriz subjacente. A MB constitui uma rede ininterrupta que contorna completamente as lâminas epidérmicas secundárias, penetrando profundamente em suas criptas (Figura 6D).

Nos aumentos maiores (20000 μ m) foi possível determinar a presença de pequenas formações eletrodensas na superfície basal do plasmalema das células germinativas. Neste caso, trata-se de estruturas protéicas, denominadas hemidesmossomos, nos quais se ancoram as proteínas que fazem a ligação com a MB (Figura 6C).

3.2.2 Grupo Laminite

As lâminas epidérmicas secundárias dos eqüinos deste grupo estão afiladas e apresentaram contorno indefinido ou mesmo ausente em alguns campos. Houve diminuição do número de células basais e o tamanho daquelas encontradas foi reduzido (Figura 7A). Relativamente ao formato, as poucas células basais encontradas estavam disformes, com perda do formato cilíndrico característico. Em muitos cortes, registrou-se a ausência de células basais, permanecendo em seu lugar apenas o espaço correspondente, vazio em alguns casos ou preenchido por queratina, em outros (Figura 7B).

Os núcleos normalmente ovalados se encontravam arredondados ou com forma indefinida (Figura 7C, D).

Na maioria dos cortes dos eqüinos deste grupo a MB estava ausente ou rompida e afastada das células basais. O número de hemidesmossomos nestes casos estava diminuído. Adicionalmente, houve desorganização do citoesqueleto, o que tornou impossível a distinção entre as lâminas epidérmicas secundárias e as lâminas dérmicas secundárias.

3.2.3 Grupo Laminite + Trinitroglicerina

As lâminas epidérmicas do Grupo Laminite se encontravam desorganizadas o que tornava a análise difícil, pois em muitos locais não eram visualizadas as lâminas dérmicas secundárias. Da mesma forma, as células basais também estavam desorganizadas e muito próximas da MB, o formato originalmente cilíndrico havia desaparecido, tornando estas células arredondadas e com o núcleo bastante globoso (Figura 8B).

Na conexão da derme com a epiderme, a MB encontrava-se ondulada e irregular ou ainda, muitas vezes, rompida ou ausente (Figura 8A).

Os hemidesmossomos responsáveis pela união entre as células basais e a MB estavam ausentes ou separados destas (Figura 8C).

O citoesqueleto havia desaparecido em muitos pontos, ficando no seu lugar uma substância bem clara e, em muitos locais, apenas o espaço vazio (Figura 8B).

Em muitas áreas, o material celular estava rarefeito e as lâminas dérmicas secundárias se encontravam envolvidas pela MB, porém retraídas e enrugadas. Nos locais onde a MB se encontrava desprendida da epiderme não foram encontrados hemidesmossomos íntegros, causando no observador a impressão que permaneciam aderidos às células basais ou aos restos de membrana celular (Figura 8D).

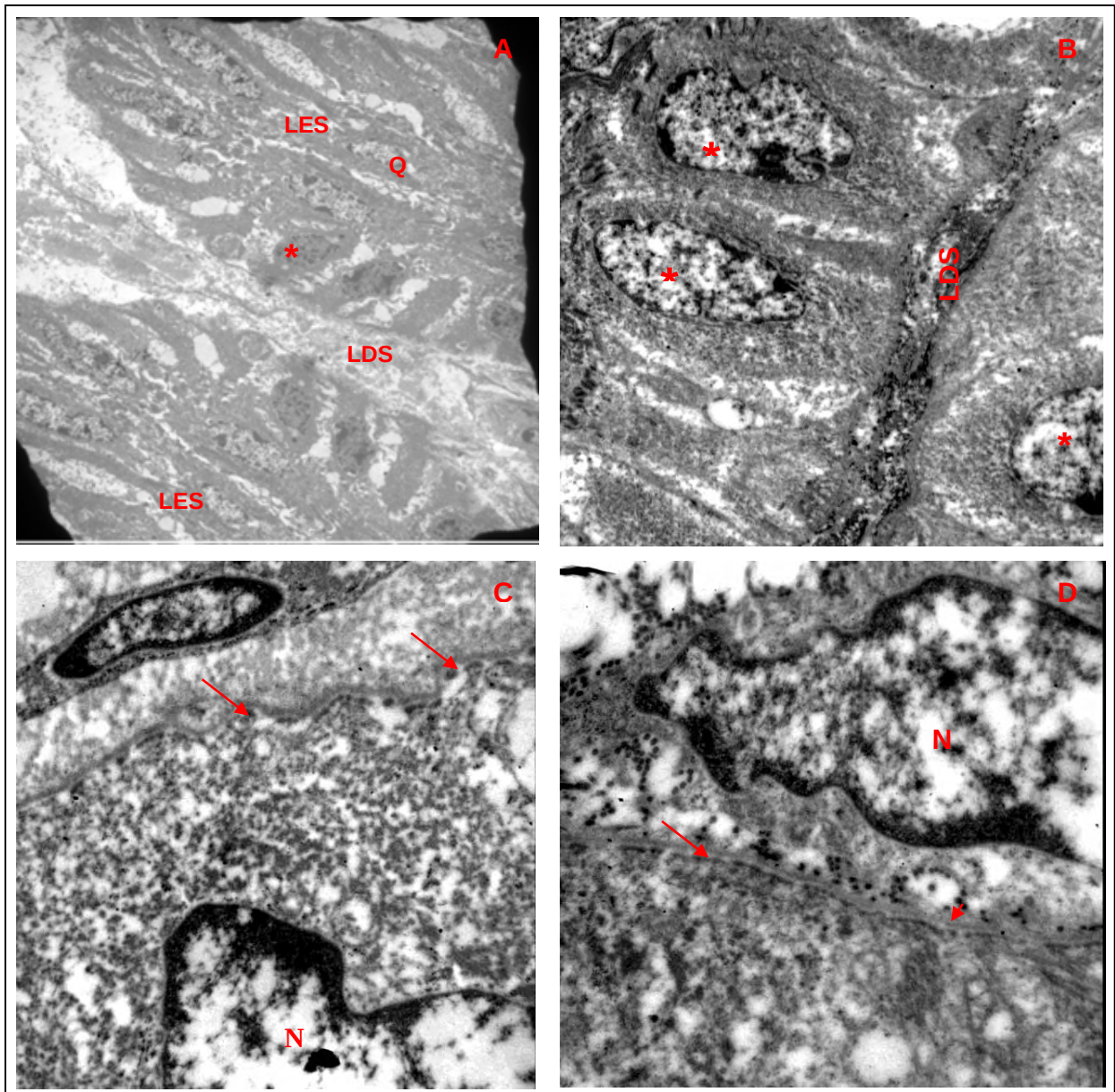


Figura 6: Eletromicrografia de transmissão das lâminas epidérmicas secundárias de cascos de eqüinos do Grupo Controle. Em A as lâminas epidérmicas secundárias (LES), presença de células basais (*) com o seu núcleo em formato oval, situados no ápice da célula em posição oposta a membrana basal e a lâmina dérmica secundária (LDS) separando duas LES e queratinócitos no meio das lâminas epidérmicas secundárias (Q) (aumento de 2000 μ m). Em B a membrana basal é uma linha contínua sem rupturas contornando completamente as lâminas epidérmicas secundárias e penetrando profundamente em suas criptas. As células basais (queratinócitos) estão conectadas à derme pela zona de membrana basal (junção dermoepidérmica). Em C presença de hemidesmossomos (seta) acompanhando a membrana basal em todo o seu percurso, núcleo da célula basal (N) (aumento de 20000 μ m). Em D observam-se duas regiões da membrana basal: uma lâmina lúcida (seta), eletro-esparsa, abaixo das células basais (queratinócitos), e a outra, a lâmina densa ou basal (cabeça de seta) (aumento de 20000 μ m).

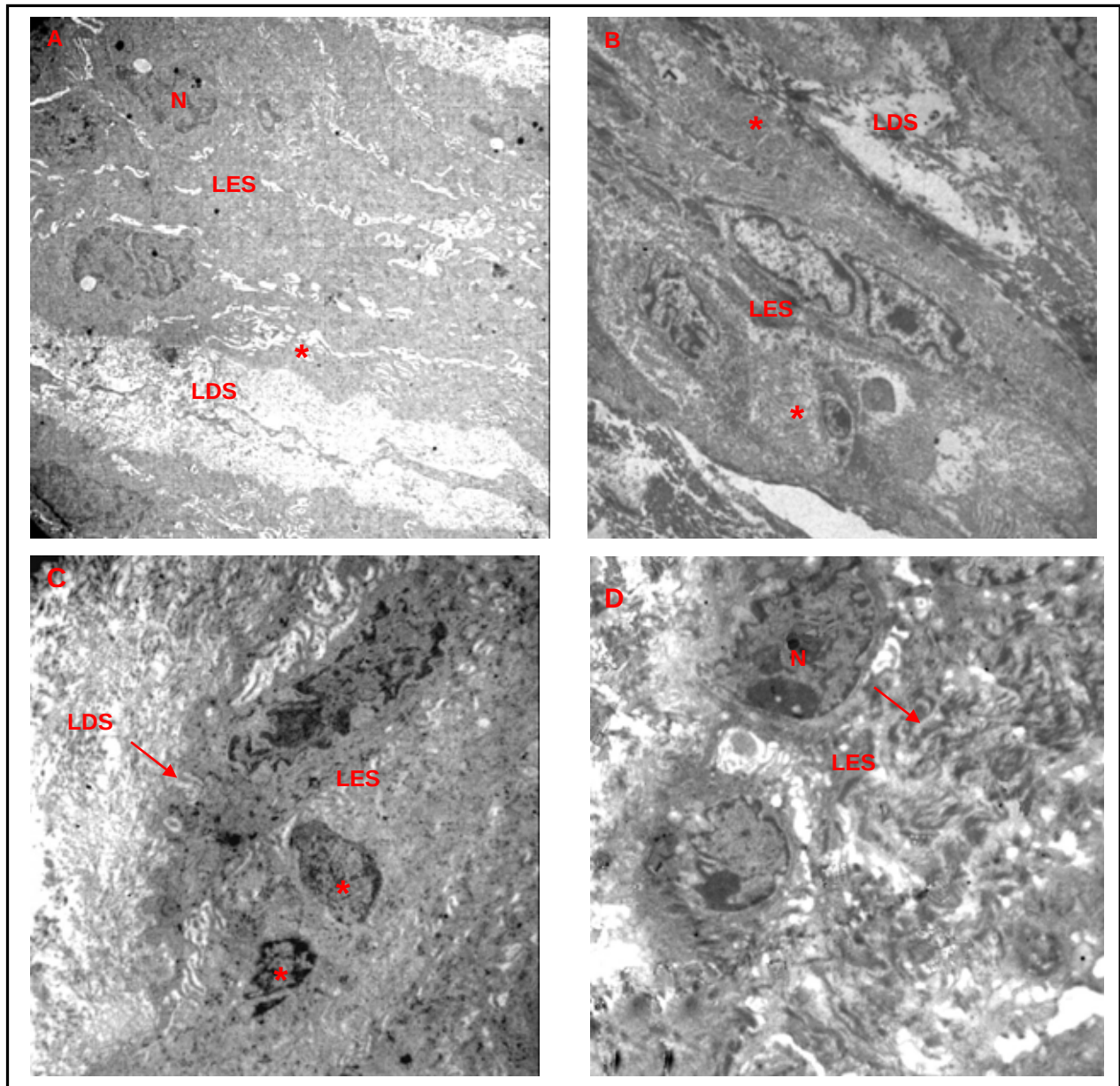


Figura 7: Eletromicrografia de transmissão das lâminas epidérmicas secundárias de cascos de eqüinos do Grupo Laminite. A - Ausência de núcleos em várias células (*). Aumento de 5000 μ m. B - Lâmina epidérmica secundária estreita e sem células basais (*). Aumento de 5000 μ m. C - Células basais com núcleos de formatos arredondados (*), localizados próximo à membrana basal, que se encontra ondulada (seta). Aumento de 7500 μ m. D Núcleos de forma irregular (N), e lâmina epidérmica secundária alterada, na qual ilustra-se sua queratinização (seta). Aumento de 7500 μ m.

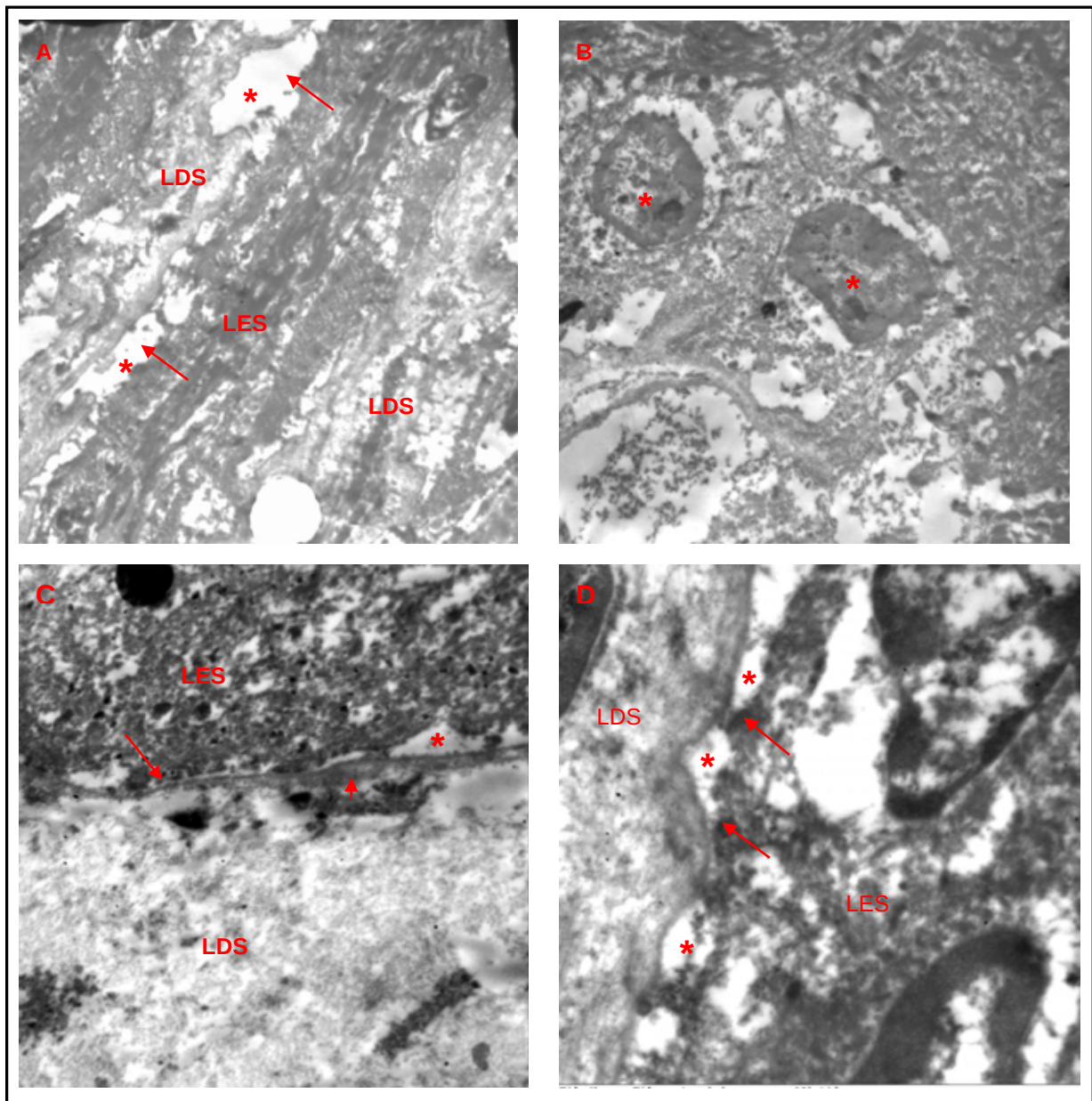


Figura 8: Eletromicrografia de transmissão das lâminas epidérmicas secundárias de cascos de eqüinos do Grupo Laminite + Trinitroglicerina. Na figura A visualiza-se as lâminas epidérmicas secundárias (LES) e lâminas dérmicas secundárias (LDS), com ausência de células basais (*) ilustrando em muitos lugares, a membrana basal separada da LES (seta) (aumento 3000 μ m). Figura B apresenta células basais (*) com os seus núcleos globosos (aumento de 5000 μ m). Na figura C observam-se duas regiões: uma lâmina lúcida, eletro-esparsa, abaixo dos hemidesmossomos (seta), e a outra, a lâmina densa ou basal (cabeça de seta) mais espessa. Regiões com descolamento da membrana basal e ausência de hemidesmossomos (*) (aumento de 10000 μ m). A figura D ilustra a presença de hemidesmossomos (seta) e o descolamento da membrana basal das células basais (*) (aumento de 20000 μ m).

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A interface entre as lâminas epidérmicas e dérmicas secundárias contém a estrutura que faz a adesão entre a muralha do casco e a falange distal. Tanto o casco como a falange distal recebem o apoio da coluna de ossos dos membros, sendo, conseqüentemente, responsáveis pela sustentação do corpo do animal. Calcula-se que para um cavalo de 500kg, cada centímetro quadrado dos cascos dos membros anteriores receba cerca de 2kg de peso, peso este que se eleva para mais de 14kg durante o galope ou seja, a integridade das estruturas lamelares é fundamental para a atividade locomotora dos eqüinos (WILLIAMS & DEACON, 1999).

Nos cavalos do Grupo Controle encontrou-se condição de integridade características dos cascos em condições de receber a massa corporal tanto em repouso como em movimento. Nos eqüinos deste grupo as lâminas epidérmicas secundárias apresentavam contorno bem definido, o ápice lamelar se mostrava arredondado e as células basais tinham formato poliédrico e estavam alinhadas na base lamelar, perfeitamente justapostas. Acredita-se que o formato das células basais se deva à ação modeladora do citoesqueleto e devido à pressão exercida pelas outras células. Se ocorrerem danos aos hemidesmossomos, desmossomos ou à membrana basal, o citoesqueleto das células basais entra em colapso e a célula basal interrompe a sua função normal e apropriada.

Na porção central da lâmina epidérmica secundária foram encontradas células diferentes das células basais, os queratinócitos, os quais possuem formato fino e alongado. Estas células produzem matriz queratinizada pela qual estão envolvidas. Segundo POLLITT (1998), ao longo de sua vida, os queratinócitos maduros se aproximam cada vez mais da superfície externa do casco, empurrados por células recém formadas. Durante este trajeto estas células se tornam achatadas e alongadas e são gradativamente substituídas pela queratina que formam e que acaba prevalecendo sobre o conteúdo celular. Em momento ainda não completamente determinado, o aumento de queratina culmina com a morte celular. Neste ponto, o tecido se resume exclusivamente a queratina sendo responsável pela formação do estrato córneo.

Relativamente à morte celular, alguns trabalhos têm relatado a ocorrência de grande número de células em apoptoses. Estes trabalhos indicaram que o número de células apoptóticas no casco de eqüinos durante o estado fisiológico normal é baixo e que o aumento no número das células basais apoptóticas detectadas nos cavalos com laminite pode indicar que a apoptose é um fator importante na patogênese desta doença. Além disso, a relação de detecção das células com fragmentação do DNA nas lâminas dérmicas primárias e secundárias nos cavalos com laminite aguda naturalmente adquirida pode indicar que a necrose destes queratinócitos conduz a falha estrutural das lamelas associada à laminite (FALEIROS et al, 2004).

Revestindo a lâmina epidérmica secundária encontrou-se a MB, no caso deste grupo, bastante íntegra e uniforme, com suas camadas bem definidas, das quais projetavam as proteínas de ancoragem. Foi possível determinar a presença das proteínas de ancoragem que fazem a ligação entre os hemidesmossomos das células basais e a MB. Segundo FRENCH & POLLITT (2004), os hemidesmossomos têm importância fundamental na manutenção da adesividade entre as lâminas dérmicas e epidérmicas. Os hemidesmossomos são estruturas protéicas semelhantes aos desmossomos. Os desmossomos apresentam a forma de discos e são encontradas no plasmalema de células adjacentes nas quais se dispõem aos pares, um em cada plasmalema, ligando-se por meio de proteínas. Trata-se o hemidesmossomo do mesmo disco, porém único, que se dispõe na face da célula em contato com o tecido conectivo, não possuindo, portanto, a contraparte. Como o desmossomo, a função do hemidesmossomo é a de ancorar as proteínas de ligação que, neste caso, fazem ponte com a MB (POLLITT, 2007).

No presente trabalho, a avaliação morfométrica dos fragmentos de cascos retirados dos grupos indicou diferenças quantitativas e qualitativas detectáveis na microscopia eletrônica de transmissão.

As lâminas epidérmicas e dérmicas secundárias dos cascos dos eqüinos dos grupos laminite e laminite + trinitroglicerina tiveram alterações importantes, como afilamento das lâminas, diminuição de sua largura, perda da arquitetura lamelar, separação da membrana basal das células basais, como descrito por POLLITT (1996) e

SAMPAIO et al (2004). Nos grupos laminite e laminite + trinitroglicerina visualizaram-se áreas com ausência de células basais ou resquícios destas, além de várias células basais e seus núcleos com tamanho reduzido, o que se deve à falta de aporte nutricional feito por difusão pela membrana basal. Estas células, normalmente ligadas umas às outras por desmossomos estavam separadas devido à ruptura ou degeneração das fibras de ancoragem destes desmossomos. Com isto as células dos grupos laminite e laminite + trinitroglicerina modificaram o seu formato e, isto pode ter ocorrido devido aos espaços vazios deixados por células que sofreram lise e/ou pela desorganização do citoesqueleto, assim como pela ausência da justaposição das células.

FRENCH & POLLITT (2004) observaram que algumas células basais diminuíram de tamanho, seus núcleos arredondados estavam situados anormalmente próximos à zona da membrana basal, segundo esses pesquisadores, as células basais e a estrutura da zona da membrana basal das lâminas dos cascos foram afetadas de maneira dose-dependente após a administração nasogástrica de oligofrutose. No presente trabalho foram encontradas lesões semelhantes no Grupo Laminite, entretanto, no Grupo Laminite + Trinitroglicerina as alterações nas células basais e seus núcleos forneciam a impressão de edema celular, as células e os núcleos apresentavam-se globosos, com o núcleo ocupando praticamente todo o citoplasma. Atribuiu-se estas alterações as lesões causadas por maior aporte de óxido nítrico, a nível celular.

Segundo FLORA FILHO et al., (2000) qualquer célula do organismo tem a capacidade de produzir iNOS sob estímulos apropriados. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas, que deveria ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes.

Nesta pesquisa foram encontradas nos grupos laminite e laminite + trinitroglicerina várias áreas celulares ocupadas por queratina, que segundo FALEIROS et al. (2004) ocorrem devido à apoptose celular causando a queratinização do local, porém, o desaparecimento das células pode ser devido à necrose celular, fornecendo a impressão de encolhimento das lâminas epidérmicas secundárias, pois somente o eixo queratinizado da mesma, fica visível.

Foram observadas várias alterações na membrana basal, como interrupções e/ou fragmentações. Também foi possível notar a separação da MB das células basais da LES, sendo possível visualizar-se um espaço aparentemente vazio entre a MB e a LES, semelhante ao reportado por POLLITT (1996). Nesta separação, os hemidesmossomos ficavam fixados em restos de membrana celular, porém na maioria das vezes, eles haviam desaparecido coincidindo com outro estudo que também evidencia o desaparecimento dos hemidesmossomos (FRENCH & POLLITT, 2004). Entretanto, em muitas áreas, havia resquícios de membrana basal de um lado e a presença de hemidesmossomos de outro, fornecendo a impressão de desagregação das fibras de ancoragem.

No presente estudo quando comparada entre os três grupos a área da célula, observou-se diferenças entre os dois grupos induzidos, verificando-se que as lesões são menores, isto é, menos intensas no grupo Laminite + Trinitroglicerina do que no grupo Laminite, porém quando comparada a porcentagem da área da célula ocupada pelo núcleo a diferença não foi significativa, concluindo-se que as degenerações celulares são as mesmas nos dois grupos.

Contudo, algumas questões podem ser levantadas para melhor compreender as lesões ocorridas na laminite eqüina assim definir o início destas lesões, porém, parece ser indiscutível a ocorrência precoce de alterações nas fibras de ancoragem, responsáveis pela união da membrana basal aos hemidesmossomos, como atestado pelos achados da presente pesquisa.

Assim, novos estudos com estes objetivos podem e devem ser estimulados para que, ao final, se possa dar credibilidade científica ao que este e outros trabalhos já

sinalizam, viabilizando o desenvolvimento de novos procedimentos experimentais na tentativa de elucidar os fatores responsáveis por estas alterações degenerativas.

V. REFERÊNCIAS

- BAILEY, S.R., ELLIOTT, J. Plasma 5-hydroxytryptamine constricts equine digital blood vessels in vitro: implications for pathogenesis of acute laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.30, p.124-130, 1998.
- BAILEY, S.R., RYCROFT, A., ELLIOTT, J. Production of amines in equine cecal contents in an in vitro model of carbohydrate overload. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2656-2662, 2002.
- BAILEY, S.R., MARR, C.M., ELLIOTT, J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horses. **The Veterinary Journal**, v.167, p.129-142, 2004.
- BERHANE, Y., ELLIOTT, J., BAILEY, S.R. Assessment of endothelium-dependent vasodilation in equine digital resistance vessels. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.29, n. 5, p.387-95, 2006.
- BRYANT, C.E., ELLIOTT, J. Nitric oxide: a friend or foe? **Equine Veterinary Education**, v.6, n.2, p.59-64, 1994.
- BURCH, G.E. HARB J.M, SUN C.S. Fine structure of digital vascular lesions in Raynaud's phenomenon and disease. **Angiology**. v.30, p.361-376, 1979.
- EADES, S.C., STOKES A.M., MOORE, R.M. Effects of an endothelin receptor antagonist and nitroglycerin on digital vascular function in horses during the prodromal stages of carbohydrate overload-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 1204-11, 2006.
- 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, and glucose in blood obtained from horses following carbohydrate overload. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 1, p. 87-94, 2007.
- EKFALCK, A., RODRIGUEZ, H., OBEL, N. Histopathology in post-surgical laminitis with a peracute course in a horse. **Equine Veterinary Journal**, v.24, p.321-324, 1992.

- ELLIOTT, J, BERHANE, Y, BAILEY, S.R. Effects of monoamines formed in the cecum on equine digital blood vessels and platelets. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 1124-1131, 2003.
- 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.
- FLORA FILHO, R., ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.3, p.265-271, 2000.
- FRENCH, K.R., POLLIT, C. C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 3, p. 230-235, 2004.
- HINCKLEY, K.A., FEARN, S.A., HOWARD, B.R. et al. Nitric oxide donors as treatment for grass induced acute laminitis in ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, p.17-28, 1996.
- HOOD, D.M., GROSENBAUGH, D.A., MOSTAFA, M.B. et al. The role of vascular mechanisms in the development of acute laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.7, n.4, p.228-34, 1993.
- HOFF, T.K., HOOD, D.M. e WAGNER, I.P. Effectiveness of glyceryl trinitrate for enhancing digital submural perfusion in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p.648-652, 2002.
- INOUE, S. Possible continuity of subplasmalemmal cytoplasmic network with basementmembrane cord network: ultrastructural study. **Journal of Cell Science**. v.108, p.1971-1976, 1995.
- LABEL, M.G., DICKSON, C. Citoesqueleto y moléculas de adhesión implicadas en las estructuras de comunicación y unión de los queratinocitos. Los desmosomas y hemidesmosomas. **Educacion Medica Continua**. v.6, n.3, p.183-200, 2000.
- LINFORD, R.L. A radiographic, morphometric, histological and ultrastructural radiographic findings for sound and foot sore thorough breeds and horses with

- experimentally induced traumatic and alimentary laminitis. 1987. Thesis (PhD) – *University of California, Davis*, 1987.
- MOORE, J.N., ALLEN, D., Jr & CLARK, E.S. Pathophysiology of acute laminitis. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 5, p. 67-72, 1989.
- MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **Journal Clinical Investigation**, v.78, p.1-5, 1986.
- OBEL, N. Studies on the histopathology of acute laminitis. **Almquist and Wiksells** Uppsala, Suécia. 1948.
- PERONI, F.J., MOORE, J.N., NOSCHKA, E., GRAFTON, M.E., ACEVES-AVILA, M., LEWIS, S.J., ROBERTSON, T.P. Predisposition for venoconstriction in the equine laminar dermis: Implications in equine laminitis. **Journal of Applied Physiology**, v.100, p.759-763, 2006.
- 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. The anatomy and physiology of the hoof wall. **Equine Veterinary Educations**. n.4, p.3-10, 1998
- POLLITT, C.C. Equine laminitis in Australia. Visto em <<http://www.uq.edu.au/~apcpolli/>>. Acessado em 20 de maio, 2007.
- ROBERTS, E.A., OCHOA, R., HAYNES, P.R. Correlation of dermal-epidermal laminar lesions of equine hoof with various disease conditions. **Veterinary Pathologic**. v.17, p.656-666, 1980.
- SAMPAIO, R.C.L., CANOLA, J.C., LACERDA NETO, J.C., MORAES, J.R. Histologic alterations of the basement membrane of the dermal and epidermal layers of the hoof in horses with acute laminitis. **International Journal of Morphology**, v. 22, n. 4, p.307-312, 2004.
- WILLIAMS, G., DEACON, M. No foot, no horse. **Kenilworth Press**: Addington, UK. 1999.

CAPÍTULO 4: LAMINITE EQÜINA EXPERIMENTAL: ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL E MORFOMÉTRICA DOS HEMIDESMOSSOMOS.

RESUMO - Os hemidesmossomos são estruturas de adesão localizadas no pólo inferior da célula basal. Recebem este nome por sua similaridade à microscopia eletrônica com a metade de um desmossomo, do qual diferem notavelmente em sua composição. Possuem uma placa citoplasmática intracelular à qual se unem feixes de filamentos intermédios (queratinas 5 e 14) e proteínas que se projetam em direção ao meio externo. Isto lhes permite se associar com os miofilamentos por um extremo, estes responsáveis em conduzir informações ao núcleo, e com os filamentos de ancoragem pelo outro lado que por sua vez atravessam o espaço da lâmina lúcida para se aderir a lâmina densa. Neste trabalho avaliou-se ultra-estruturalmente, por meio de morfometria, o efeito da trinitroglicerina, um precursor do óxido nítrico, na prevenção da laminite aguda em eqüinos. Foram utilizadas amostras do casco de quinze eqüinos adultos. Em estudo anterior, estes animais foram distribuídos em três grupos: Controle, Laminite e Laminite + Trinitroglicerina, constituídos cada um de cinco animais. Para as análises ultra-estruturais foram selecionadas as interfaces entre as lâminas epidérmicas e dérmicas secundárias dos cascos de eqüinos desses grupos. A análise estatística demonstrou diferenças nos três grupos estudados nas seguintes variáveis: número de hemidesmossomos por μm de membrana basal (NB) e densidade numérica de hemidesmossomos por μm^2 de membrana basal (NS), porém não diferiram estatisticamente nas outras comprimento dos hemidesmossomos (B_{HD}), diâmetro dos hemidesmossomos (HD_T), porcentagem de área do plasmalema basal da célula ocupada pelos hemidesmossomos ($\% \text{Área}_{HD}$). Os eqüinos do Grupo Controle apresentaram, em média, 4,63 hemidesmossomos por comprimento em μm de membrana basal, enquanto que o Grupo Laminite e o Grupo Laminite+trinitroglicerina apresentaram 3,454 e 2,910 de hemidesmossomos por μm de membrana basal, respectivamente, apresentando diminuição significativa, porém não diferiram entre os dois grupos induzidos. A densidade numérica de hemidesmossomos por μm^2 de

membrana basal nos grupos induzidos foi semelhante, não havendo diferença nos dois grupos induzidos, porém, quando comparado com o Grupo Controle esta densidade numérica foi menor. Concluindo-se que o uso tópico da trinitroglicerina não teve efeito preventivo nas lesões lamelares de eqüinos com laminite induzida por CHO.

I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Os eqüinos para desenvolver suas atividades, seja de trabalho ou de esporte, necessitam contar com a seguridade de seus membros, o que está intimamente relacionada com o funcionamento de seus cascos, que por sua vez depende da integridade do sistema de engrenagem queratopodofiloso responsável pela união entre a muralha do casco e a falange distal.

Ao se examinar o interior do casco, observa-se que as lâminas do casco, a olho descoberto, constituintes do estrato epidérmico laminar, se compõem de lâminas de forma retangular, delgadas com aproximadamente 7 mm de largura e 50 mm de comprimento. Estas estruturas são denominadas lâminas epidérmicas primárias, possuindo um eixo queratinizado, o qual é responsável pela ligação da base destas lâminas com a muralha do casco, estando no lado oposto o ápice dessas lâminas que se lançam em direção à falange distal (POLLITT, 1998). Durante a formação das lâminas epidérmicas, o sulco coronário interno abre caminho, e a camada proliferativa de células basais forma dobras ao longo do perímetro lamelar formando assim as lâminas epidérmicas secundárias (POLLITT, 2007). As lâminas epidérmicas secundárias possuem células responsáveis pela formação de queratina nos cascos.

O ápice das lâminas, tanto primárias quanto secundárias, está orientado em direção a falange distal, indicando uma linha de tensão à qual o aparato suspensório lamelar está fortemente aderido (STUMP, 1967).

Na interface da epiderme e da derme, existe uma fina camada de matriz-extracelular, denominada membrana basal (MB). Esta estrutura é o ponto chave de união entre as células basais de um lado e um fino tecido conectivo de fibrinas (colágeno do tipo I) que emana da superfície dorsal da falange distal, de outro. Ao exame pela microscopia eletrônica de transmissão visualiza-se a membrana basal com três camadas contínuas que contornam as células basais. É uma lâmina tridimensional, interligada por finos cabos interconectados os quais se dispõem como a malha de uma rede (POLLITT, 1994). O esqueleto axial da célula basal se une a esta rede de cabos. A rede consiste em proteínas colagenosas como o colágeno tipo IV e não colagenosas como proteoglicanas e glicoproteínas, das quais a principal é a laminina (INOUE, 1989).

A glicoproteína laminina, um dos principais componentes da membrana basal, foi identificada na membrana basal lamelar eqüina por meio de imuno-histoquímica com marcadores monoclonais de laminina anti-humana. As lamininas têm papel importante no jogo de diferenciação e união associadas às células epidérmicas, e acredita-se que o sulfato proteoglicano de heparina influencia a passagem de íons pela membrana basal (LEBLON & INOUE, 1989) causando a perda destas moléculas na membrana basal lamelar, como pode acontecer durante o desenvolvimento da laminite, e que teria implicações importantes na fisiopatologia da laminite. Devido à ativação do plasminogênio sintetase nas células basais de mamíferos, a plasmina assim poderia digerir a laminina. A plasmina poderia alcançar concentrações elevadas no plasma durante doença tais como o endotoxemia (POLLITT, 1994).

Segundo POLLITT et al. (2003) a membrana basal eqüina parece ter suas características proporcionalmente aumentadas conferindo força e resistência à membrana basal e seus tecidos adjacentes. A ligação entre as células basais e a membrana basal é feita pelo complexo de filamentos de ancoragem-hemidesmosomos. Estas estruturas são constituídas pela porção extracelular do antígeno 2 do penfigóide ampoloso (BPAG2), a $\alpha_6\beta_4$ Integrina, a laminina 5, o BP 180 e

a proteína LAD-1, que unem as células basais à membrana basal (LABEL & DICKSON, 2000).

Os hemidesmosomos são estruturas de adesão localizadas no pólo inferior da célula basal. Recebem este nome por sua similaridade ao microscópio eletrônico com meio desmosomo, porém diferem notavelmente em sua composição. Possuem uma placa citoplasmática intracelular à qual se unem feixes de filamentos intermédios (queratinas 5 e 14) e proteínas que se projetam em direção ao meio externo. Isto lhes permite se associar com os miofilamentos por um extremo, estes responsáveis em conduzir informações ao núcleo, e com os filamentos de ancoragem pelo outro lado que por sua vez atravessam o espaço da lâmina lúcida para se aderir a lâmina densa (LABEL & DICKSON, 2000). A estrutura intracelular dos hemidesmosomos é semelhante a dos desmosomos, mas as proteínas transmembranares que ligam a célula às proteínas que formam a lâmina basal são as integrinas $\beta 4$ e não as caderinas (LABEL & DICKSON, 2000).

Os filamentos de ancoragem são glicoproteínas que atravessam a lâmina lúcida, compostos de colágeno tipo VII, BP 180, laminina 5 e unceína (LABEL & DICKSON, 2000).

POLLITT (1999) e JOHNSON et al. (2000) consideraram a possibilidade da ativação descontrolada de metaloproteinases ser o evento importante e precoce na patogênese da laminite eqüina, por ocorrer degradação enzimática na MB por ação desta enzima.

POLLITT & DARADKA (1998) isolaram dois membros da família da matriz de metaloproteinase (MMP-2 e MMP-9) de lâminas da muralha de cascos normais, de cultivos de lamelas expostas e cultura de tecido médio, onde surgiu a hipótese que a ativação da matriz de metaloproteinase seria a responsável pela separação das células epidérmicas basais da membrana basal que ocorre na laminite e que este processo pode ser inibido pelo inibidor de metaloproteinase.

Outra teoria formulada por POLLITT & DAVIES (1998) e JOHNSON et al. (1998) afirma que o *Streptococcus bovis*, na fase prodrômica da laminite, seria o responsável pela produção das substâncias que ativariam a metaloproteinase causando

degeneração da membrana basal e conseqüente desorganização das lâminas dérmicas e epidérmicas.

Segundo POLLITT (1996) e POLLITT & DARADKA (1998) a laminite ocorreria em conseqüência da ação da metaloproteinase ativada por moléculas com baixo peso molecular e não pela formação de microtrombos onde as lesões isquêmicas e as coagulopatias sistêmicas ocorreriam secundariamente e/ou paralelamente às lesões da MB. PASS et al. (1998) em pesquisa com o metabolismo da glicose na laminite relataram que, a separação da célula epidérmica basal da MB ocorre quando agentes como o 2-deoxiglicose e o acetato aminofenilmercúrico (reconhecido como um ativador da metaloproteinase) inibem a utilização da glicose pelo tecido do casco. Todavia, não se sabe ainda se a inibição do metabolismo da glicose poderia causar o desenvolvimento da laminite “in vivo” como aconteceu nesta pesquisa realizada “in vitro”.

Exames ultra-estruturais dos tecidos de cavalos com laminite mostram lesões na zona da membrana basal, conexão derme/epiderme, nos quais, os primeiros elementos a falharem são os hemidesmossomos e os filamentos de ancoragem. Entretanto a separação do casco ocorre por dois mecanismos diferentes. Em um, a privação de glucose faz com que os hemidesmossomos desapareçam induzindo o colapso do citoesqueleto das células basais epidérmicas e, no outro, a ativação química da matriz de metaloproteinase presentes nas células basais epidérmicas destrói os filamentos de ancoragem, deixando hemidesmossomos no plasmalema basal da célula intacto (FRENCH & POLLITT, 2004).

Considerando-se a importância da laminite em plantéis eqüinos, com perdas significativas de animais de alto valor racial e econômico, e que as alterações das estruturas epidérmicas e dérmicas desempenham papel chave no desenvolvimento da afecção, esta pesquisa teve como objetivo estudar as alterações ultra-estruturais desenvolvidas 48 horas após indução da laminite, enfatizando-se as alterações ocorridas na membrana basal do casco.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizadas amostras do casco de quinze eqüinos adultos, sem raça definida, seis machos e nove fêmeas, com idades variando entre quatro e sete anos. A alimentação diária foi constituída de 2,0 kg de ração concentrada, fornecida uma vez ao dia, além de feno e sal mineral *ad libitum*. A água estava disponível em cochos apropriados colocados nas baias. Estes animais foram, distribuídos em três grupos, constituídos de cinco animais cada:

Grupo Controle: Formado por eqüinos hígidos, que não receberam sobrecarga de carboidrato e que por razões de ordem humanitária ou econômica foram submetidos à eutanásia (Grupo I).

Grupo Laminite: Constituído por eqüinos submetidos a jejum de 12 horas que receberam por meio de sonda nasogástrica, 17,6g de amido/kg de peso vivo (Maizena®)⁸, diluído em solução aquosa 1:1, para indução de laminite. Estes animais não receberam nenhum outro tipo de tratamento (Grupo II).

Grupo Laminite + Trinitroglicerina: Os animais deste grupo receberam o amido na quantidade e diluição semelhantes ao grupo anterior. Ao completarem 24 horas da administração de sobrecarga de carboidratos as faces palmares dos boletos dos membros torácicos foram tricotomizadas aplicando sobre estas sachês contendo, cada um, 20 mg de trinitroglicerina (Nitradisc®)⁹ os quais foram fixados sobre a pele com esparadrapo, permanecendo no local até completar-se 48 horas após a administração do carboidrato (Grupo III).

Após eutanásia, realizada 48 horas após a administração de carboidratos nos dois grupos, as extremidades distais dos quatro membros foram desarticuladas na

⁸ Maizena® - UNILEVER DO BRASIL

⁹ Nitradisc® 10 mg - SEARLE

altura da articulação metacarpo-falangeana e metatarso-falangeana, para os membros torácicos e pélvicos, respectivamente.

Os cascos foram seccionados com uma serra de fita, de acordo com protocolo descrito por POLLITT (1996). Obteve-se fragmento retangular da muralha interna do casco, com lados medindo 1,0 x 0,5 cm e espessura de 0,1 cm, contendo a interface entre as lâminas dérmicas e epidérmicas.

2.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Para as análises ultra-estruturais foram selecionadas as interfaces entre as lâminas epidérmicas e dérmicas secundárias dos cascos de eqüinos dos grupos Controle (Grupo I), Laminite (Grupo II) e Laminite + Trinitroglicerina (Grupo III), contendo componentes celulares e matriz extracelular.

Os cortes foram fixados em glutaraldeído a 3% (fixador primário) em 0,1M de Buffer de cacodilato de sódio (pH 7,3) por 24 horas. Posteriormente, retiradas e colocadas em solução tampão em um procedimento que se repetiu por duas vezes seguidas como lavagem para retirar o fixador. Os blocos foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (fixador secundário) por 3 horas, desidratados com concentrações crescentes de etanol, etanol e acetona (1:1) e finalmente em acetona (100%). O processo de pré-inclusão foi feito com agente desidratante (acetona 100%) mais uma mistura de resina (Araldite 502, Embed 812)¹⁰ em proporção acetona-resina 2:1 durante uma hora, 1:1 *overnight* e 1:2 por duas horas. O procedimento de inclusão foi feito com mistura de resina, colocados em moldes de silicone e cápsulas *beem*, que foram à estufa a 60° C por 72 horas para polimerização do araldite. Um pré-corte com navalha de vidro foi realizado com secções finas, para análise do material. Em etapa subsequente, secções ultrafinas foram cortadas com navalha de diamante, coradas

¹⁰ Araldite 502/Embed 812 Kit E.M.S Washington

com citrato de chumbo Reynold's e 50% de acetato de uranila em etanol e visualizados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1010. As imagens selecionadas foram armazenadas em computador para análise morfométrica, utilizando-se um sistema de análise de imagem computadorizada (Imagem Pró Plus, versão 4.1.0.0).

2.3 Morfometria

No estudo morfométrico, foram analisadas aproximadamente 480 μm de membrana basal, por animal, localizadas nas lâminas epidérmicas secundárias (LES) do casco de eqüinos. Estas análises foram realizadas depois de tomadas fotográficas por meio do microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1010, com aumento de 10.000x. Os hemidesmossomos (HD) foram contados aleatoriamente usando ampliação digital de 10X para facilitar a visualização. O comprimento da membrana basal e dos hemidesmossomos foram medidos utilizando-se um sistema de análise de imagem computadorizada, o Imagem Pró Plus.

Foram contados os números de hemidesmossomos por micrômetro de membrana basal (N_B). O comprimento de cada HD foi medido considerando-se que os HDs eram discos finos e lisos. O comprimento de HD (B_{HD}) foi convertido ao diâmetro verdadeiro de HD (HD_T) pela fórmula: $HD_T = 4/\pi \times B_{HD}$ (MANDIGAN & HOLDEN, 1992).

Usando estes parâmetros, a densidade numérica de HDs por unidade de superfície do plasmalema da membrana basal ($N_S = HDs / \mu\text{m}^2$) foi derivado da equação: $N_S = N_B / HD_T + (4/\pi t)$

Utilizando-se os mesmos cálculos anteriores, a densidade numérica de HDs por unidade de superfície de plasmalema das células basais (N_s) foi derivada e então a porcentagem da área de plasmalema das células basais ocupadas por HD foi obtida (%)

da área $_{HD}$). Calculada pela formula $\% \text{ Área}_{HD} = (\text{Numero de HD por } \mu\text{m}^2 \times \text{área HD}) / \mu\text{m}^2 \times 100\%$ (MANDIGAN & HOLDEN, 1992).

Os valores de N_B , e a $\% \text{ area}_{HD}$ foram comparados entre os três grupos estudados. Os diferentes parâmetros estudados foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA), Teste de Tukey, com nível de significância $P < 0,05$, realizado mediante o procedimento do SAS (Statistical Analysis System).

III. RESULTADOS

Na análise estatística houve diferenças nos grupos induzidos quando comparados com o grupo controle nas seguintes variáveis: número de hemidesmossomos por μm de membrana basal (NB) e densidade numérica de hemidesmossomos por μm^2 de membrana basal (NS), porém, nas outras variáveis: comprimento dos hemidesmossomos (B_{HD}), diâmetro dos hemidesmossomos (HD_T) e porcentagem de área do plasmalema basal da célula ocupada pelos hemidesmossomos ($\% \text{ Área}_{HD}$) não foram observadas diferenças.

Os eqüinos do Grupo Controle (Grupo I) apresentaram em média 4,63 hemidesmossomos por μm de membrana basal, enquanto que o Grupo Laminite e o Grupo Laminite + Trinitroglicerina apresentaram 3,454 e 2,910 de hemidesmossomos por μm de membrana basal respectivamente, denotando diminuição significativa quando comparados ao Grupo Controle, porém, sem diferir entre si.

A densidade numérica de hemidesmossomos por μm^2 de membrana basal nos grupos induzidos foi semelhante, não havendo diferença nos dois grupos, porém, quando comparados com o Grupo Controle foram menores (Tabela 3).

Os hemidesmossomos são placas eletrodensas situadas no pólo basal das células basais, sendo responsáveis pela união dessas células com a membrana basal (Figura 9A). Na microscopia eletrônica de transmissão aparecem como várias placas

negras próximas à membrana basal (Figura 9B). Os desmossomos são responsáveis pela união intercelular e aparecem como duas placas eletrodensas unidas por microfilamentos (Figura 9C). Os hemidesmossomos acompanham a membrana basal por toda a sua extensão e estão ligados a elas pelos filamentos de ancoragem, que atravessam o espaço da lâmina lúcida para aderir-se à lâmina densa (Figura 9D).

Nos eqüinos dos Grupos Laminite e Laminite + Trinitroglicerina as células estavam separadas umas das outras e em alguns lugares a membrana basal estava rompida (Figura 10A). Os grupos induzidos apresentavam várias áreas da membrana basal descoladas das células basais (Figura 10B), nos locais onde ocorria esta separação existiam hemidesmossomos unidos a restos celulares ou, em muitos pontos haviam desaparecido completamente (Figura 10B). O Grupo Laminite + Trinitroglicerina foi o que apresentou degeneração mais intensa (Figura 10C), entretanto, em alguns cortes notava-se, material ainda intacto e apesar da ausência de células basais, pôde-se observar hemidesmossomos em quase toda a extensão da membrana basal e a presença de desmossomos e bastante queratina, porém com ausência de células basais, visualizando-se apenas os queratinócitos. (Figura 10D).

Tabela 3. Média $\pm$ EPM do número, comprimento e diâmetro dos hemidesmossomos (HD), assim como HD por μm^2 e a porcentagem de HD por área de plasmalema, de casco de eqüinos dos grupos Controle, Laminite e do grupo Laminite + Trinitroglicerina, durante o período estudado.

Variáveis	GRUPOS		
	Controle n=2252	Laminite n=1181	Laminite + Trinitroglicerina n=1392
Número de HD	4,630 ^A $\pm 0,15$	3,454 ^B $\pm 0,43$	2,910 ^B $\pm 0,17$
Comprimento dos HD (μm)	0,099 ^A $\pm 0,003$	0,106 ^A $\pm 0,01$	0,102 ^A $\pm 0,02$
Diâmetro dos HD (μm^2)	0,12 ^A $\pm 0,003$	0,15 ^A $\pm 0,01$	0,17 ^A $\pm 0,03$
HD por μm^2	40,20 ^A $\pm 1,63$	25,65 ^B $\pm 3,00$	23,33 ^B $\pm 2,00$
Porcentagem de HD por área de plasmalema (%)	43,990 ^A	42,710 ^A	37,430 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre si na mesma linha.

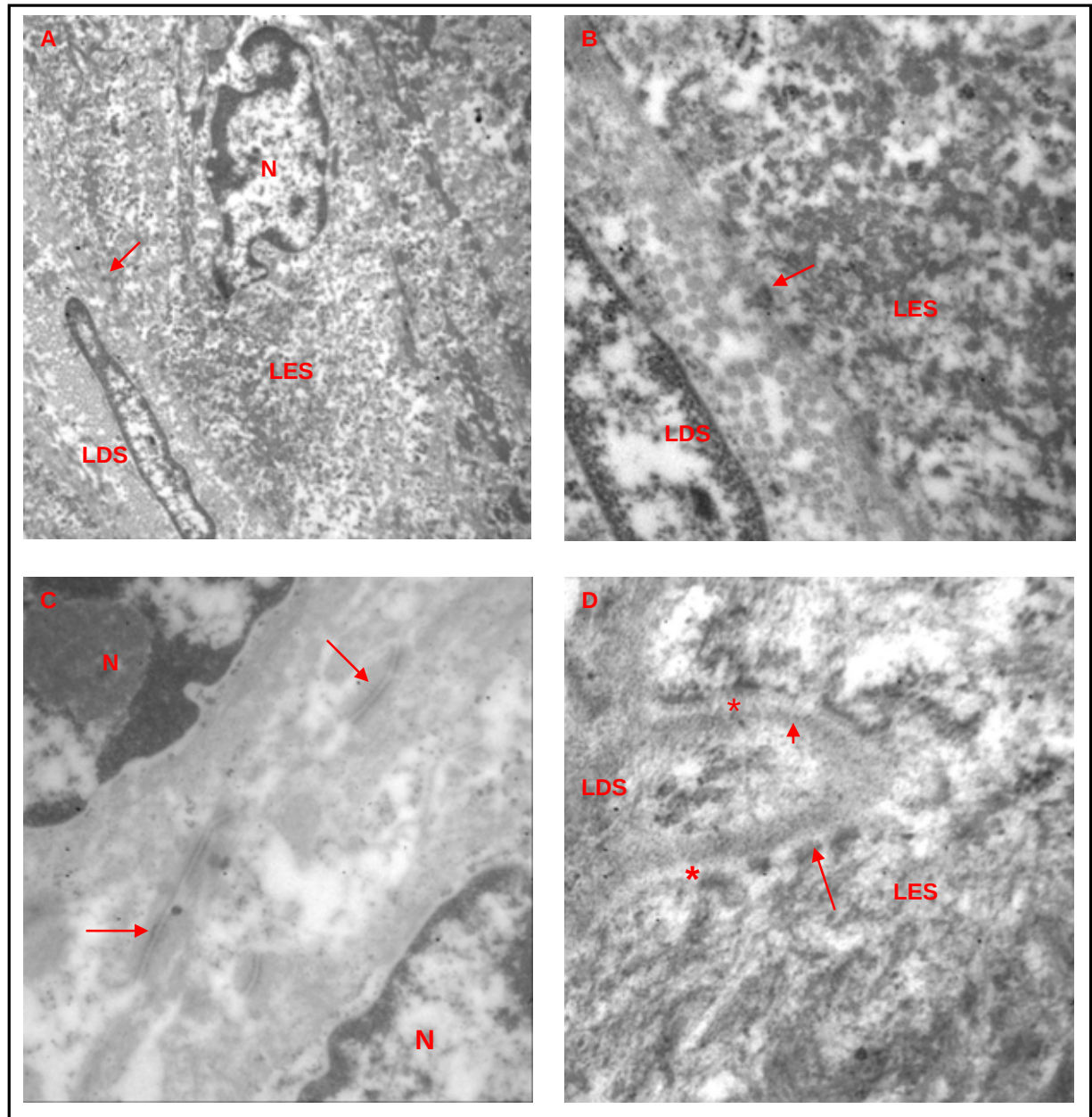


Figura 9 – Eletromicrografia de transmissão dos eqüinos do Grupo Controle. Em A lâmina epidérmica secundária (LES), lâmina dérmica secundária (LDS) e o núcleo basal (N), presença de hemidesmossomos (seta). Aumento de 10 μ m. Em B lâmina epidérmica secundária (LES) e a lâmina dérmica secundária (LDS) entre elas a presença de hemidesmossomos (seta). Aumento de 40 μ m. Em C núcleos das células basais (N) e a junção de duas células e a placa de desmossomos (setas). Aumento de 40 μ m. Em D lâmina epidérmica secundária (LES), lâmina dérmica secundária (LDS), os hemidesmossomos (seta) acompanhando a membrana basal e os filamentos de ancoragem (*) atravessando o espaço da lâmina lúcida para aderir-se à lâmina densa (cabeça de seta). Aumento de 60 μ m.

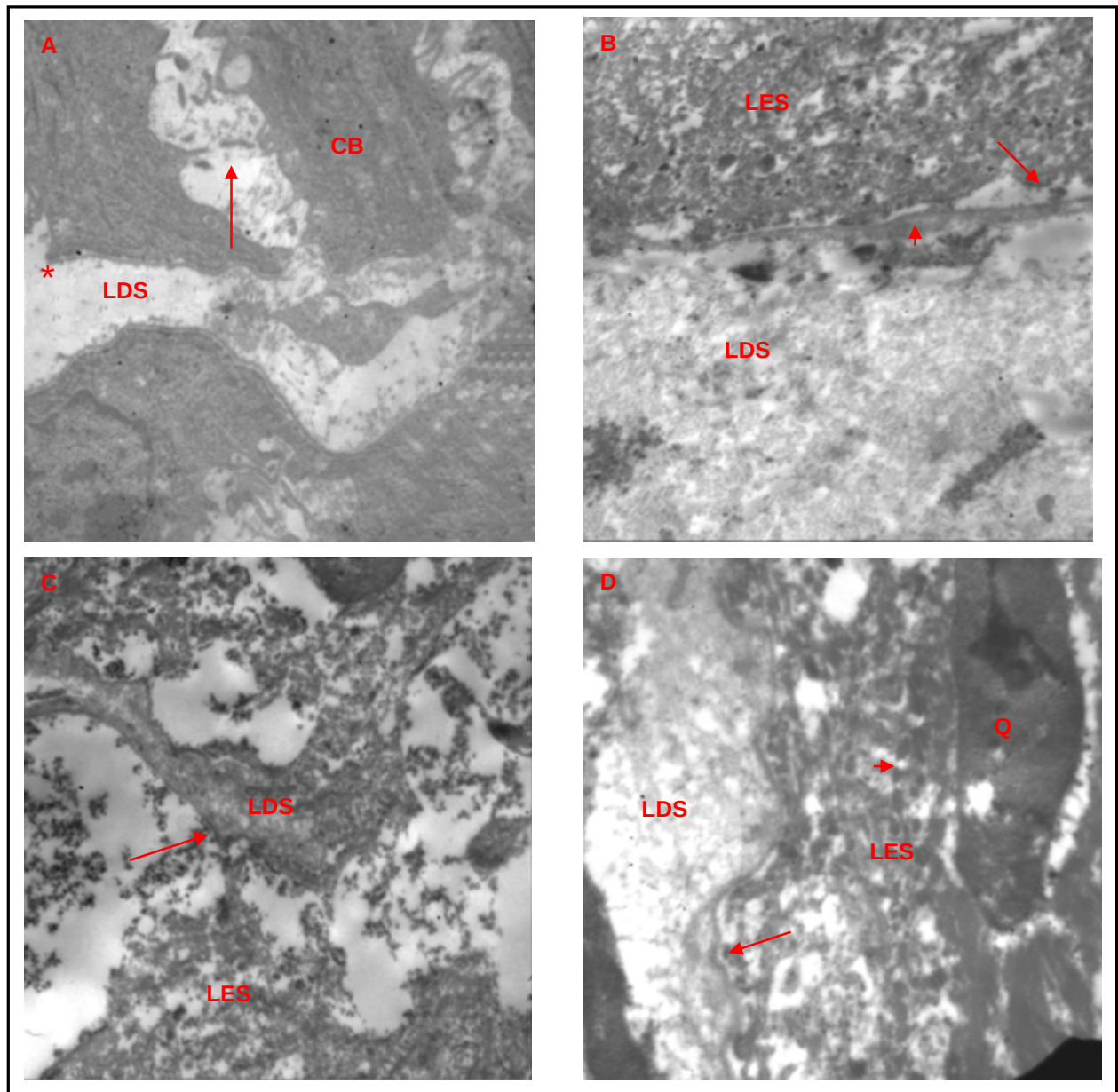


Figura 10 – Eletromicrografia de transmissão dos eqüinos do Grupo Laminite. Em A células basais com separação (seta) e rompimento da membrana basal (*). Aumento de 10 μ m. Em B perda de hemidesmosomos e a separação da lâmina epidérmica secundária (LES) (seta) da membrana basal (cabeça de seta). Aumento de 15 μ m. Grupo Laminite + Trinitroglicerina - em C ausência de células basais nas lâminas epidérmicas secundárias LES, membrana basal (seta) contornando a lâmina dérmica secundária (LDS). Aumento de 10 μ m. Em D lâmina epidérmica (LES) unida à lâmina dérmica secundária (LDS) pelos hemidesmosomos (seta), presença de desmosomos (cabeça de seta) unindo o queratinócito (Q) a restos celulares. Aumento de 15 μ m.

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo, mediante exame ultra-estrutural da junção epidermal-dermal dos eqüinos do grupo controle identificou-se hemidesmosmosomas (HDs) nas células, e fazendo a conexão destes com a lâmina lúcida, uma das camadas da membrana basal (MB), estavam presentes os filamentos de ancoragem (FAs). À visualização, os HDs acompanhavam toda a extensão da MB. Segundo LABEL & DICKSON (2000) a associação de HDs com FAs é muito importante para a manutenção da união estável entre a célula e a MB, além de transportar informações da MB aos queratinócitos. Esses autores também relataram que os HDs são compostos por Integrina $\alpha 6 \beta 4$, plectina HD1, BP 180 e colágeno do tipo XVII, enquanto que os FAs, são compostos pelas proteínas glicoproteínas (uniceína e laminina 5 e 6). POLLITT (1994) relatou que a laminina 5 e o colágeno do tipo XVII são os constituintes dos HDs e que o colágeno do tipo VII é o maior constituinte dos FAs.

Ao longo dos séculos a laminite vem sendo foco de interesse clínico e científico e, conseqüentemente, estudos microscópicos abordando as alterações lamelares que ocorreram nas primeiras 48 a 96 horas após a indução com CHO. Porém, até o presente momento, não foram realizadas pesquisas referentes a morfometria ultra-estrutural das lâminas epidérmicas dos casco de eqüinos com laminite induzida com sobrecarga de carboidratos e tratados com trinitroglicerina.

A análise ultra-estrutural da junção epidérmica-dérmica dos grupos com laminite induzida com sobrecarga de CHO indicou diminuição no número total de HDs, assim como no número de HDs por μm^2 nos dois grupos. As reduções foram maiores no grupo Laminite + Trinitroglicerina.

Segundo ALLEN et al. (1990) a ocorrência de venoconstricção e conseqüente pressão hidrostática elevada de fluido intersticial, impedem o fluxo sangüíneo na microcirculação lamelar causando necrose isquêmica da lâmina epidérmica. Supondo que esta venoconstricção acometa as lâminas dérmicas dos cascos de eqüinos na fase prodrômica da laminite impedindo a irrigação local e, conseqüentemente, promovendo

diminuição no número de HDs tratou-se com a trinitroglicerina o grupo Laminite + Trinitroglicerina, uma vez que a venoconstrição seria o mecanismo responsável pela laminite, e a aplicação tópica de trinitroglicerina na quartela de eqüino, preveniria a doença quando utilizado previamente (HINCKLEY et al., 1996).

O evento histológico chave da laminite em eqüinos é a separação entre a lâmina epidérmica secundária e a lâmina dérmica secundária. Esta separação ocorre entre as células basais e a MB (POLLITT, 1996). Segundo FRENCH & POLLITT (2004) os primeiros elementos a falharem são os HDs e os FAs, responsáveis pela ligação entre as células basais e a MB.

POLLITT et al. (1998) verificou que as metaloproteinases (MMPs) eram as responsáveis pela renovação tecidual em situações normais e quando ativadas desordenadamente causam a separação da MB da epiderme laminar. Este pesquisador observou que as formas ativas destas enzimas degradadoras da MB estavam presentes nos tecidos lamelares de eqüinos afetados pela laminite, em quantidades aumentadas, 48 horas após a administração de carboidratos na indução da laminite. Atribuindo à ação de metaloproteinases (MMP2 e MMP9) a separação que ocorreu entre as células basais e a MB impedindo a nutrição e informações às células, acarretando degeneração e conseqüente desaparecimento dos HDs (POLLITT e DARADKA, 1998). Este aumento na produção de MMP pelos queratinócitos lamelares é provocado, possivelmente, pela chegada de citocinas pela circulação sangüínea lamelar dilatada (POLLITT & DAVIS, 1998).

Em outra teoria POLLITT & DAVIES (1998) e JOHNSON et al. (1998) afirmaram que o *Streptococcus bovis*, na fase prodrômica da laminite, seria o responsável por liberar substâncias que ativariam a metaloproteinase, causando degeneração da MB e conseqüente desorganização das lâminas dérmicas e epidérmicas. PASS et al. (1998) relataram que a privação de glicose proveniente da resistência à insulina causaria inibição da utilização da glicose pelas células do casco, sendo o fator gatilho para a ativação das metaloproteinases que poderiam causar a separação das células epiteliais da MB.

A separação entre a epiderme lamelar e a derme lamelar foi reconhecida como a primeira entidade mórbida na laminite. Relatou-se que colágenos do tipo IV e VII, constituintes da membrana basal, foram destruídos por endopeptidases dependentes do zinco (matriz de metaloproteinases) durante o primeiro estágio da laminite.

HINCKLEY et al (1996) e RAGLE (1999), verificaram que nas horas iniciais de tratamento, os sinais clínicos de dor aumentaram, possivelmente devido à resolução da isquemia tecidual e o retorno da percepção da dor. HINCKLEY et al. (1996) descreveram que a dor fica evidente durante a reperfusão que ocorre após 12 horas da aplicação de trinitrato de gliceril. Esta resposta, entretanto, normalmente diminui dentro das primeiras seis a 24 horas de tratamento. Em trabalho publicado por WEISS (1997), a infusão de L-arginina intravenosa, que é precursor de óxido nítrico, resulta em rápida melhora do fluxo sanguíneo da muralha dorsal do casco. Entretanto, BAXTER et al (1989), aplicaram L-arginina intravenosa em dois cavalos saudáveis e não obtiveram aumento no fluxo sanguíneo laminar.

Em cavalos com laminite induzida com sobrecarga de CHO, o relaxamento mediado pela acetilcolina foi reduzido em vasos digitais “in vitro”, causando vasoconstrição, sugerindo que a capacidade de produção do óxido nítrico pelo endotélio vascular danificado estava reduzida, com isto os vasos tornam-se mais sensíveis ou vulneráveis a agentes vasoconstritores (SCHNEIDER et al., 1999). Por outro lado BRYANT & ELLIOT (1994), afirmaram que a utilização de precursores de óxido nítrico, denominados nitrovasodilatadores, apresentou resultados clínicos promissores quando utilizados em cavalos com laminite.

Neste trabalho os eqüinos do grupo Laminite + Trinitroglicerina apresentaram maior redução no número de HDs em comparação com o grupo Controle. Verificou-se que além da trinitroglicerina não prevenir a laminite ocorreu o agravamento das lesões que acometeram os HDs, os quais juntamente com os FAs, são os responsáveis pela estabilidade do tecido lamelar.

A diminuição no número de hemidesmossomos pode ter ocorrido pela ação de metaloproteinases, consideradas as responsáveis pela degradação da laminina presentes nos filamentos de ancoragem. As metaloproteinases são ativadas por

citocinas, estas por sua vez, foram liberadas pela ação do *Streptococcus bovis* no ceco dos animais que sofreram aumento exponencial desta bactéria, as citocinas atravessam a mucosa intestinal e pela circulação chegam até a região digital, ativando assim as metaloproteinases (POLLITT, 1998).

A sobrecarga de carboidratos aumenta a produção de glicose com conseqüente aumento da insulina e da produção de NO. Esta liberação insulino-mediada de NO induz vasodilatação e aumenta a captação celular de glicose e o seu metabolismo (WAJCHENBERG, 2002)

Mensuração direta do fluxo digital na laminite aguda identificou aumento no fluxo do sangue em conseqüência da resistência vascular diminuída (vasodilatação) (ROBINSON et al., 1976). Similarmente, TROUT et al., (1990) não poderiam aceitar a isquemia lamelar como causa primária da laminite porque estudos cintigráficos não-invasivos da circulação digital mostraram elevação significativa do fluxo sanguíneo sub-lamelar antes da claudicação.

Segundo POLLITT & DAVIES (1998), na laminite eqüina induzida por sobrecarga de carboidratos, ocorre vasodilatação digital e o fluxo sanguíneo digital reduzido foi, provavelmente, o resultado de lesões lamelares. Virtualmente todos os capilares, normalmente presentes na derme entre as lâminas epidérmicas secundárias de cada lamela estavam ausentes nos tecidos lamelares afetados pela laminite. Seu desaparecimento coincidiu com a perda da MB lamelar. A perda destes capilares pode explicar porque a resistência ao fluxo do sangue foi aumentada 3,5 vezes nos cavalos durante o início da laminite (ALLEN et al., 1990) e porque o sangue contornava o leito capilar, por meio das anastomoses arteriovenosas dilatadas nos cavalos com laminite aguda (HODD et al., 1978).

Em que pese HINCKLEY et al. (1996) e RAGLE (1999) terem descrito melhora clínica em cavalos com laminite tratados com trinitroglicerina, os achados deste trabalho comprovam que na laminite induzida por CHO, ocorrem lesões graves nas ultra-estruturas do casco eqüino. Desta forma, pode-se concluir que o uso tópico da trinitroglicerina não previne as lesões presentes na laminite induzida por CHO.

V. REFERÊNCIAS¹¹

- ALLEN D., JR., CLARK E.S., MOORE J.N., et al. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p.1930-1934, 1990.
- BAXTER G.M., TACKETT R.L., MOORE J.N. Reactivity of equine palmar digital arteries and veins to vasodilating agents. **Veterinary Surgery**, v.18, p.221-226, 1989.
- BRYANT, C.E., ELLIOTT, J. Nitric oxide: a friend or foe? **Equine Veterinary Education**, v.6, n.2, p.59-64, 1994.
- FRENCH, K. R., POLLIT, C. C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. **Equine Veterinary Journal**, v.36, n.3, p.230-235, 2004.
- HINCKLEY K.A., FEARN S., HOWARD B.R., et al. Nitric oxide donors as treatment for grass induced acute laminitis in ponies. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p.17-28, 1996.
- HOOD D.M., AMOSS M.S., HIGHTOWER D. Equine laminitis I: Radioisotopic analysis of the hemodynamics of the foot during the acute disease. **Journal Equine Medical Surgery**, v. 2, p. 439, 1978.
- INOUE, S. Ultrastructure of basement membranes. **International Review of Cytology**, v.117, p.57-98, 1989.
- JOHNSON, P. J., KREEGER, J.M., KEELER, M., GANJAM, V.K., MESSER, N.T. Serum markers of lamellar basement membrane degradation and lamellar histopathological changes in horses affected with laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.32, n.6, p.462-468, 2000.
- JOHNSON, P.J., TYAGI, S.C., KATWA, L.C. GANJAM, V.K., et al. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. **The Veterinary Record**, v.142, n.15, p.392-396, 1998.

¹¹ De acordo com a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) – N.B.R. – 6023 Ago/2002.

- LABEL, M.G., DICKSON, C. Citoesqueleto y moléculas de adhesión implicadas en las estructuras de comunicación y unión de los queratinocitos. Los desmosomas y hemidesmosomas. **Educacion Medica Continua**, v.6, n.3, p.183-200, 2000.
- LEBLOND, C.P., INOUE, S. Strucuture, composition and assembly of basement membrane. **American Journal of Anatomy**, v.185, p.367-390, 1989.
- MANDIGAN & HOLDEN, Reduced Epithelial Adhesion After Extended Contact Lens Wear Correlates With Reduced Hemidesmosome Density in Cat Cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.33, n.2, 1992
- PASS, M. A., POLLITT, S., POLLITT, C.C. Decreased glucose metabolism causes separation of hoof lamellae in vitro: a trigger for laminitis? **Equine Veterinary Journal**, v.26, p.133-138, 1998 (Suplemento).
- POLLITT, C.C. The basemente 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. The anatomy and physiology of the hoof wall. **Equine Veterinary Education**, n.4, p.3-10, 1998.
- POLLITT C.C., DAVIES C.T. Equine laminitis: its development coincides with increased sublamellar blood flow. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. v. 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. v.26, p. 139-144, 1998.
- POLLITT, C.C., PASS, M.A., POLLITT, S. Batismat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, suppl. v.26, p.119-124, 1998.
- POLLITT, C.C., KYAW-TANNER, M., FRENCH, K. R., EPS, A. W. VAN, HENDRIKZ, J. K., DARADKA, M. Equine laminitis. **Proceedings of America Association of Equine Practitioners**, p.21-25 November 2003.
- POLLITT C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. **Proceedings of America Association of Equine Practitioners**, v.45, p.188-192, 1999.

- POLLITT, C.C. Microanatomy of the hoof wall. Visto em <<http://www.uq.edu.au/~apcpolli/>> Acessado em 20 de junho de 2007.
- RAGLE, C.A. Nitroglycerin treatment of equine laminitis. **Compendium on Continuing Educacion for the Practicing Veterinarian**, 21:2, 170-174, 1999.
- ROBINSON, N.E., SCOTT, J.B., DABNEY, J.M., et al. Digital vascular responses and permeability in equine alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p.1171-1174, 1976.
- SCHNEIDER, D.A., PARKS, A.H., EADES, S.C., et al. Palmar digital vessel relaxation in healthy horses and in horses given carbohydrate. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, p.233-239, 1999.
- STUMP, J. E. Anatomy of the normal equine foot including microscopic features of the laminar region. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.151, p.1588-1598, 1967.
- TROUT, D.R., et al. Scintigrafic evaluation of digital circulation during the developmental and acute phases of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 6, p. 416-421, 1990.
- WAJCHENBERG B. L. Disfunção Endotelial no Diabetes do Tipo 2. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica**, v. 46, n. 5, 2002.
- WEISS, D.J., Equine laminitis; a review of recent research. **Equine Practice** v.19, n. 1, p. 16-20, 1997.