

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

**TAMPONAMENTO CECAL: ASPECTOS CLÍNICO,
FISIOPATOLÓGICO E TERAPÊUTICO NA LAMINITE
EXPERIMENTAL EM EQÜINOS.**

Adriana Helena de Souza

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

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

JABOTICABAL- SÃO PAULO- BRASIL

janeiro – 2007

S719t Souza, Adriana Helena de
Tamponamento cecal: aspectos clínico, fisiopatológico e terapêutico na laminite experimental, em eqüinos. / Adriana Helena de Souza. -- Jaboticabal, 2007
xxi, 75 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Carlos Augusto Araújo Valadão
Banca examinadora: José Corrêa de Lacerda Neto, Luiz Cláudio Nogueira Mendes, Rafael Resende Faleiros, Rita de Cássia Campebell
Bibliografia

1. Equinos. 2. Laminite. 3. Ceco. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ADRIANA HELENA DE SOUZA – nascida em São Paulo, SP, em 03 de maio de 1972, filha de Marta Fonseca de Souza e Sebastião Naves de Souza, é Médica Veterinária, formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Câmpus de Jaboticabal em dezembro de 2000. Desenvolveu trabalho de Iniciação Científica durante o período de graduação tendo sido bolsista do programa PIBIC-CNPq. Mestre em Cirurgia Veterinária, em fevereiro de 2003, pelo programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da mesma instituição, quando também foi orientada pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, com trabalho de dissertação intitulado: “EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AMITRAZ SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DE E. Coli OU INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β), EM COELHOS”. Realizou estágio de doutoramento pelo Programa de Doutorado com Estágio no Exterior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (PDEE - CAPES) durante o período de setembro de 2004 a fevereiro de 2005 junto a School of Veterinary Medicine da Louisiana State University em Baton Rouge, Louisiana, EUA sob supervisão do Dr. Rustin R. Moore.

Sobre os caminhos e a vida...

Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram.

Alexandre Graham Bell

A coisa não está nem na partida nem na chegada, mas na travessia.

Guimarães Rosa.

*Os caminhos surgem na medida em
que os percorremos.*

Werner Sprenger

À **Deus**, pela presença constante em minha vida, sempre iluminando meu caminho.

Ao meu **pai, Sebastião Naves de Souza**, por acreditar que a educação seria a melhor herança para seus filhos.

À minha **mãe, Marta Fonseca de Souza**, pela sabedoria guardada na simplicidade de “ser”.

E aos dois, pelos exemplos, pelo constante incentivo e por serem tão importantes e especiais em minha vida.

OFEREÇO

Ao meu esposo, **Márcio Leão Ferraz**, pela sua ajuda imprescindível sempre, pelo apoio em todos os momentos deste trabalho e da vida, pela felicidade e amor inesgotáveis, pela eterna confiança em minhas escolhas e, principalmente, pela grande amizade.

Ao meu filhote, **Vinícius de Souza Ferraz**, que na sua ingenuidade e início de existência tornou o final dessa caminhada mais cheia de sentido e o mundo mais cheio de cor. Aguardo-te ansiosamente...

Aos meus irmãos, **Geise Lúcia de Souza e Ricardo Robson de Souza**, pelo amor especial e incondicional, cumplicidade, incentivo e compreensão que sempre me fizeram olhar em frente.

À melhor amiga-irmã ou irmã-melhor amiga, **Renata Lehn Linardi**, por todos os momentos inexplicavelmente felizes de infinito amor, crescimento e cumplicidade.

Aos meus sogros, **Carlos Oberg Ferraz e Maria de Lourdes Leão Ferraz**, pelo apoio e admiração constantes e pelo carinho sem fim.

Às minhas sobrinhas, **Giulia Carolina de Souza Firmiano e Pietra Catarina de Souza Firmiano**, por fazer meus dias mais cheios de vida.

À todos que estiveram ao meu lado.

DEDICO

Aos animais utilizados nesse experimento...

O cavalinho de pau da minha infância fazia lembrar um centauro travestido. (naquela idade não tínhamos ainda ouvido falar de centauros). Muitos mais cavalos vão povoando o nosso conhecimento e a nossa imaginação. O cavalo de Tróia de que falava o compêndio de História Universal. Pégaso, aquele cavalo alado que poderia levar-nos às nuvens. As corridas de cavalos de Dégas. Tão vivos, tão galantes esses bichos. Os cavalos do Partenon que afinal vivem aprisionados em Museus. As cabeças, mesmo depois de arrancadas dos corpos, dizem-nos tudo sobre o cavalo inteiro.

Fica por aqui esta cavalgada da memória...

“Um dia virá em que os cavalos selvagens abrandarão os galopes nervosos em procuras sem rumo e os prados verdes, sinceramente verdes, refrescarão dos seus cascos a febre.

O vento brando fará carícias de meninos nas crinas ásperas ansiosas.

As montanhas rugosas escalvadas convidarão amáveis os cavalos que as subirão sem esforço, com doçura.

Os cumes, alcançados firmes nas patas, colunas de elegância esticarão os pescoços, rolarão os olhos e sentirão o cheiro, o cheiro do universo.

Esse dia virá em que os cavalos não mais serão chamados de selvagens que a imensa mansidão do universo achado o não consentirá”.

Licínia Quitério

AGRADEÇO ESPECIALMENTE

AGRADECIMENTOS

Esta tese é o resultado de trabalho em conjunto, da cooperação e da amizade de muitas pessoas. Por isso, muitíssimo obrigada a todos aqueles cujo apoio e amizade fizeram diferença. O trabalho foi grande, mas permeado de alegrias, diversão e muitas risadas. Obrigada aos amigos e colegas.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão,
pelo educador que é, pela oportunidade de aprendizado e crescimento na sua forma mais simples e pura, pelo apoio incondicional todas as vezes que o chão parecia fugir aos meus pés, pelo amigo e pai postiço, sempre presente quando precisei de incentivo e palavras de carinho, pelo rigor e seriedade com o nosso projeto, por todas as oportunidades criadas para tornar minha formação mais completa, pela compreensão, confiança e respeito com o meu trabalho e minha vida e, principalmente, por acreditar em mim... Na verdade faltam palavras para agradecer tudo o que aprendi com você durante esses oito anos de relacionamento profissional e pessoal e de aprendizado constante.

“Os educadores precisam compreender que ajudar as pessoas a se tornarem pessoas é muito mais importante do que ajudá-las a tornarem-se matemáticas, políglotas ou coisa que o valha”. (Carl Rogers)

Isso eu aprendi com você.

Ao Dr. Rustin Moore,
pela co-orientação e ajuda nas várias etapas desse estudo, confiando em meu trabalho e disponibilizando seus laboratórios e equipe de pesquisadores, sendo essencial para minha formação. Pela amizade e carinho, tornando os caminhos fora do Brasil mais suaves de serem trilhados.

Ao grupo de trabalho,
Andréa del Pilar Uribe, Erica Cristina Bueno do Prado Guirro, Guilherme Sobrinho, Renata Gemio Reis e Renata Lehn Linardi sem os quais este trabalho seria impossível de se realizar. Obrigada pela oportunidade da convivência, risadas, e principalmente,

por ser fonte do meu crescimento profissional e pessoal durante o desenrolar da fase experimental. Espero que tenham aprendido tanto quanto eu com as dificuldades, divergências, risadas e trabalho em conjunto. Em especial, agradeço ao grande amigo que descobri durante esse trabalho em equipe, José Henrique Saraiva Borges, pela ajuda, carinho, paciência e incentivo constante para que eu seguisse em frente.

À Universidade Estadual Paulista,

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, ao Hospital Veterinário Governador “Laudo Natel” e a todos os professores, funcionários e alunos por todo o aprendizado durante esses 10 anos de convivência e formação.

A toda minha família,

meus cunhados Cleucimar Valente Firmiano, Cyro Leão Ferraz, Anália Leão Ferraz, Geórgia H. C. R. Leão Ferraz, Cássio Leão Ferraz e Ana Mirna Lisboa, meus sobrinhos Victor, Rafael, Mariana e Gabriela, e todos os tios e tias, primos e primas que de alguma forma fizeram parte de todo esse sonho.

Ao Prof. Dr. Rafael de Resende Faleiros,

por todo o conhecimento disponibilizado, ajuda e estímulo constantes, pelo carinho e amizade e principalmente, por me fazer acreditar na nova geração de educadores do nosso país, sendo fonte de inspiração e exemplo de competência e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. José Luiz Laus,

pelo grande apoio como Coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária e pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari,

pelos exemplos de profissionalismo e seriedade, pelo apoio nas várias fases desse trabalho, pela amizade, exemplos e lições de vida. Agradeço também sua esposa Lu e o seu filho Danilo pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi,
pelos ensinamentos e participação na minha formação, pela disponibilização do laboratório e equipamentos e pelo carinho de sempre.

Ao Prof. Dr. José Correa de Lacerda Neto,
pelas importantes contribuições nesse trabalho, ensinamentos, amizade e valiosos conselhos.

Aos professores doutores José Wanderley Cattelan, Júlio Carlos Canola, Newton Nunes Rosângela Zacarias Machado e Áureo Evangelista Santana, pelo carinho, amizade e exemplo de dedicação e profissionalismo com o sistema educacional.

Ao Prof. Dr. Célio Raimundo Machado,
pela oportunidade de vivenciar a experiência da docência sob sua competente e experiente orientação e pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken Iturrino,
do laboratório de Microbiologia da FCAV/UNESP, pelo carinho e amizade e pela disponibilização de seu laboratório, equipamentos, funcionários e pós-graduandos.

A Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória,
do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela disponibilização de seu laboratório e conhecimentos valiosos e, pela ajuda de suas pós-graduandas em especial, Renata Labanca, pelas análises cromatográficas, carinho e paciência.

A Dra. Ashley M. Stokes,
pela preciosa ajuda nas análises estatísticas e por todas as dicas, mesmo à distância, fundamentais para a conclusão deste trabalho. Pela amizade que nasceu desse contato e pelo carinho todas as vezes que nos encontramos por esse mundo afora.

A Dra. Sharon Chirgwin,
pela oportunidade de contato com a Biologia Molecular, pela disponibilização de seu conhecimento, laboratório, recursos, equipamentos e pela paciência, carinho e apoio.

À Louisiana State University
a School of Veterinary Medicine, ao Department of Veterinary Clinical Science, aos técnicos Catherine Koch, Cheryl, Hal, Julie, Priti Juneja, Frank Gaza e aos Professores Dr. Klein, Dr. Venugopal e Dr. Daniel Paulsen pela recepção, apoio e contribuição na minha formação e realização deste projeto.

Ao grande amigo Paulo César da Silva,
por todos os infindáveis favores, pela ajuda imprescindível, pela paciência, carinho e amizade especiais que fizeram as várias etapas deste experimento mais fáceis, rápidas e produtivas.

Um agradecimento carinhoso e especial a secretária, Jackie Bourgeois pela competência, paciência e amizade, e principalmente pelo carinho durante minha estadia na School of Veterinary da Louisiana State University.

Aos funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”,
Isaias Pereira, Celina Cavichioli Laroza, Roberto Bertanha, Carlos Roberto Januário, José Carlos Buzolli, Roberto Aparecido Pereira, Laerte Santanna de Oliveira, Edson Giangrecco, José Raimundo dos Santos, Arildo Pereira dos Santos, Maria Luiza Alves de Oliveira, Flávia Regina de Souza Soldi e Tarcísio Philadelpho Carneiro pela cooperação, ajuda imprescindível nas várias etapas desse trabalho e, principalmente, pelo carinho e amizade.

As amigas do Laboratório de Pesquisa do DCCV/FCAV/UNESP,
Cláudia Aparecida da Silva Nogueira e Renata Lemos Nagib pela ajuda nas análises laboratoriais e também à funcionária Ana, por contribuírem para que as horas de trabalho no laboratório fossem mais produtivas e alegres.

Às amigas do Departamento de Microbiologia da FCAV/UNESP, Milena Athayde, Maria Luiza Polatti, Gisele Maria de Andrade, Tammy, Katia Viviane Prochnon Troro, e especialmente, à Silvina do Carmo Pelicano Berchielli, pela grande ajuda com as análises microbiológicas e pelas muitas risadas nas longas horas contando as intermináveis colônias de bactérias.

A Prof. Dr. Elma Neide Vasconcelos Martins Carrilho, do Laboratório de Nutrição do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP, pelas dicas e disponibilização de seu laboratório e à pós-graduanda Josi pela ajuda com as análises cromatográficas.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da FCAV/UNESP, Maria Inês Yamazaki de Campos, Francisca de Assis Ardisson, Edgard Homem pela ajuda com a coleta e processamento do material da necropsia, e especialmente, ao funcionário Narcizo Batista Tel, pela ajuda incondicional, carinho e amizade de sempre.

À secretária do DCCV/FCAV/UNESP Shizuko Ota, a Maria Inês Gomes Martinez Alves de Oliveira e a Dona Nice, pela ajuda e convivência cheia de carinho e respeito.

À família Valadão, Luciana, Dudu e Tatiana pelo carinho de irmãos postiços e, em especial, a mãe postiça Inez Valadão, pelos cuidados, atenção e carinho, sempre...

Aos pós-graduandos

Thais Patelli, Daniela Mello, Vivian Palmeira, Antonio Raphael Teixeira, Juan Carlos Duque, Nilson Oleskovizck, Anderson Farias, Paulo Canola, André Escobar, Ricardo Miyasaka de Almeida e todos os demais amigos que fizeram de minha passagem pela pós-graduação uma alegre oportunidade de aprendizado.

Aos grandes amigos

Daniel Orlato, Alexandre Vogliotti, Roberto Rosa, Luciane Leoni, Stael Pedroso, Maria Luisa de Cápuia, Fernanda Guimarães (Viúva), Maria Vechetini (Durva), Juliana Lehn

Linardi e Gesiane Ribeiro pela amizade e carinho incondicionais, e pelo “teto” nas várias noites de “sem teto” em Jaboticabal.

A todas as funcionárias da Seção de pós-graduação, em especial Estela Amália Cotri, por toda a ajuda nos diversos trâmites “burocracionais” durante esses quatro anos, sempre atenciosa e paciente com as minhas solicitações.

À funcionária da seção de finanças Neusa Aparecida dos Anjos Braz por todos os problemas solucionados com carinho e paciência.

Aos funcionários da Biblioteca da FCAV/UNESP pela paciência, carinho e atenção e por todos os serviços prestados.

À Pro-reitoria de pós-graduação da UNESP, pela ajuda com os apoios recebidos pela CAPES para a Bolsa PDEE.

Ao CNPq pelo apoio financeiro com a bolsa de Doutorado e taxa de bancada para a realização e financiamento parcial deste projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a Bolsa PDEE e participação em eventos através do Convênio CAPES-PROAP.

Ao Equine Health Studies Program pelo apoio financeiro para as análises realizadas na School of Veterinary Medicine da Louisiana State University durante o doutorado sanduíche (PDEE).

E a todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram envolvidos na realização desse projeto de pesquisa e de vida, e que por acaso eu tenha deixado de mencionar aqui.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| CAPÍTULO 1 - <i>CONSIDERAÇÕES GERAIS</i> | 1 |
| 1.1 Introdução..... | 1 |
| 1.2. Revisão de Literatura..... | 4 |
| 1.2.1. Anatomia do Dígito. | 4 |
| 1.2.2. Dinâmica da Circulação Digital..... | 9 |
| 1.2.3. Laminite..... | 12 |
| 1.2.3.a. Introdução..... | 12 |
| 1.2.3.b. Fisiopatogenia da Laminite..... | 13 |
| 1.2.3.b.a. Teoria Vascular..... | 13 |
| 1.2.3.b.b. Teoria Traumática..... | 15 |
| 1.2.3.b.c. Teoria Enzimática..... | 15 |
| 1.2.3.b.d. Teoria Edócrina..... | 17 |
| 1.2.3.c Sinais Clínicos e Estágios da Laminite..... | 20 |
| 1.2.3.d. Aspectos Anatomopatológicos da Laminite..... | 29 |
| 1.2.3.e. Modelos Experimentais de Indução da Laminite Aguda... | 32 |
| 1.2.3.e.a. Modelo da Sobrecarga de CHO..... | 32 |
| 1.2.3.e.b. Modelo do Extrato de Nogueira Preta..... | 37 |
| 1.2.3.e.c. Modelo da Frutana..... | 40 |
| 1.2.3.f. Tratamentos..... | 41 |
| 1.2.3.f. Prognóstico..... | 45 |
| 1.2.4. Hidróxido de Magnésio ($Mg(OH)_2$) e Hidróxido de Alumínio ($Al(OH)_3$)..... | 45 |
| 1.3. Referências..... | 48 |
| CAPÍTULO 2 - <i>INFLUÊNCIA DO $Mg(OH)_2$ E DO $Al(OH)_3$ SOBRE OS SINAIS CLÍNICOS E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS LÍQUIDO PERITONEAL DE EQÜINOS COM LAMINITE INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR SOBRECARGA DE CARBOIDRATO</i> | 63 |
| 2.1. Introdução..... | 67 |

| | |
|---|------------|
| 2.2. Material e métodos..... | 69 |
| 2.2.1. Animais..... | 69 |
| 2.2.1.a. Preparo dos Animais..... | 69 |
| 2.2.2. Delineamento Experimental..... | 70 |
| 2.2.2.a. Grupos Experimentais..... | 70 |
| 2.2.2.b. Intervalos de Avaliação..... | 71 |
| 2.2.3 Procedimentos..... | 71 |
| 2.2.3.a. Avaliações Clínicas..... | 71 |
| 2.2.3.b. Avaliações Laboratoriais..... | 72 |
| 2.2.4. Análise Estatística..... | 75 |
| 2.3. Resultados..... | 76 |
| 2.3.1. Avaliação Clínica..... | 76 |
| 2.3.2. Análise Hematológica e Bioquímica..... | 83 |
| 2.3.3. Análise do Líquido Peritoneal..... | 93 |
| 2.3.4. Análise do conteúdo cecal..... | 100 |
| 2.4. Discussão..... | 102 |
| 2.5. Conclusão..... | 110 |
| 2.6. Referências..... | 111 |
| <i>CAPÍTULO 3: APOPTOSE DE CÉLULAS EPIDÉRMICAS LAMINARES NA LAMINITE INDUZIDA POR SOBRECARGA DE CARBOIDRATO, APÓS TAMPONAMENTO CECAL, EM EQÜINOS.....</i> | <i>118</i> |
| 3.1. Introdução..... | 122 |
| 3.2. Material e métodos..... | 128 |
| 3.2.1. Amostras..... | 128 |
| 3.2.1.a. Preparo das Amostras..... | 128 |
| 3.2.2. Metodologia de TUNEL..... | 128 |
| 3.2.3. Ensaio de Imuno-histoquímica para detecção da forma ativa de caspase-3 e caspase-14..... | 131 |
| 3.2.4. Análise Estatística..... | 132 |
| 3.3. Resultados..... | 133 |
| 3.4. Discussão..... | 140 |

| | |
|---|------------|
| 3.5. Conclusão..... | 145 |
| 3.6. Referências..... | 146 |
| CAPÍTULO 4 - TRANSCRIÇÃO DAS ENZIMAS METALOPROTEINASE-2 E -9 (MMP-2 E MMP-9) EM EQÜINOS COM LAMINITE INDUZIDA POR SOBRECARGA DE CARBOIDRATO, TRATADOS OU NÃO COM SOLUÇÃO TAMPÃO..... | 153 |
| 4.1. Introdução..... | 155 |
| 4.2. Material e métodos..... | 158 |
| 4.2.1. Amostras..... | 158 |
| 4.2.2. Extração e Tratamento do RNA..... | 158 |
| 4.2.3. Transcrição Reversa do mRNA..... | 161 |
| 4.2.4. Quantificação do mRNA pelo Sistema TaqMan®..... | 162 |
| 4.2.5. Análise Estatística..... | 164 |
| 4.3. Resultados..... | 168 |
| 4.4. Discussão..... | 173 |
| 4.5. Conclusão..... | 177 |
| 4.6. Referências..... | 178 |
| CAPÍTULO 5 - QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS EM CONTEÚDO CECAL DE EQÜINOS COM LAMINITE EXPERIMENTAL..... | 181 |
| 5.1. Introdução..... | 183 |
| 5.2. Material e métodos..... | 185 |
| 5.2.1. Amostras..... | 183 |
| 5.2.1.a. Preparo dos Animais..... | 185 |
| 5.2.2. Determinação das aminas bioativas pelo método de HPLC..... | 185 |
| 5.2.3. Análise Estatística..... | 187 |
| 5.3. Resultados..... | 188 |
| 5.4. Discussão..... | 192 |
| 5.5. Conclusão..... | 195 |
| 5.6. Referências..... | 196 |
| CAPÍTULO 6 – IMPLICAÇÕES..... | 200 |
| APÊNDICES..... | 208 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AGM: agmatina
Al(OH)₃: hidróxido de alumínio
AST: aspartato-aminotransferase
CAD: caspase-activated deoxyribonuclease
CAD_v: cadaverina
Cd: cádmio
Cd-Cu: cádmio-cobre
cDNA: DNA complementar
CHO: carboidrato
CK: creatinoquinase
CT: cycle threshold
CuSO₄: sulfato de cobre
CV: coeficiente de variação
DAB: 3,3'- diaminobenzidina
dATP: dinucleotídeo trifosfato de adenosina
dCTP: dinucleotídeo trifosfato de citidina
DEPC : dietilpirocarbonato
dGTP: dinucleotídeo trifosfato de guanosina
dH₂O: água deionizada
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxiribonucléico
dNTP: dinucleotídeo trifosfato
DP: desvio padrão
DTT: ditioneitol
dTTP: dinucleotídeo trifosfato de timidina
EDTA: ácido etileno diamino tetracético
EGG: éter gliceril guaiacol
EP: erro padrão
EPD: espermidina

EPM: espermina
ET-1: endotelina-1
EUA: Estados Unidos da América
FA: fosfatase alcalina
FC: frequência cardíaca
FEA: feniletilamina
FR: frequência respiratória
GAS: grupo controle (água+salina)
GAT: grupo tampão (água+tampão)
GC : glicocorticóide
GCS: grupo CHO (CHO+salina)
GCT: grupo CHO-tampão (CHO+tampão)
H&E: hematoxilina e eosina
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
H₂SO₄: ácido sulfúrico
HCl: ácido clorídrico
HIM: histamina
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
Ht: hematócrito
ICAD: inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
IL-1: interleucina-1
IL-1 β : interleucina-1 β
IL-6: interleucina-6
IM: intramuscular
IV: intravenoso
LDP: lâmina dérmica primária
LDS: lâmina dérmica secundária
LEP: lâmina epidérmica primária
LES: lâmina epidérmica secundária
LP: líquido peritoneal
LSU: Louisiana State University

MB: membrana basal
MC: motilidade cecal
Mg(OH)₂: hidróxido de magnésio
MgO: óxido de magnésio
MO: coloração da mucosa oral
M-MLV: Murine Moloney Leukemia Vírus
MMP-2: metaloproteinase 2
MMP-9: metaloproteinase 9
mRNA: RNA mensageiro
NaOH: hidróxido de sódio
NO: óxido nítrico
NP: noqueira preta
P_A: pressão arterial facial
PAS: ácido periódico de Schiff
PBS: tampão salina-fosfato
PCR: reação da cadeia de polimerase
PO: via oral do greco-romano *per oralis*
PT: proteínas totais
PUT: putrescina
RNA: ácido ribonucléico
RT: transcriptase reversa
RT-PCR: reação da cadeia de polimerase com transcrição reversa
SAS: Statistical Analysis System
SDS: dodecilsulfato de sódio
SRT: serotonina (5-HT)
TAE: tampão tris – acetato - EDTA
TCA: ácido tricloracético
TdT: terminal deoxinucleotidil transferase
TIM: tiramina
TPC: tempo de preenchimento capilar
TR: temperatura retal

TRM: triptamina

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling

ZnSO₄: sulfato de zinco

TAMPONAMENTO CECAL: ASPECTOS CLÍNICO, FISIOPATOLÓGICO E TERAPÊUTICO NA LAMINITE EXPERIMENTAL EM EQÜINOS

RESUMO – Inúmeros estudos vêm sendo realizados objetivando esclarecer os mecanismos da laminite aguda em eqüinos. Muitos destes esclarecendo ou suscitando dúvidas sobre teorias já descritas; outros sugerindo novos mecanismos cruciais no desenvolvimento da laminite. Modelos *in vitro* e *in vivo*, focados na inflamação, distúrbios hemodinâmicos, ativação enzimática no dígito e eventos gastrintestinais somam-se para explicar sinais clínicos observados na laminite. Apesar da existência de dados correlacionando alterações metabólicas, mudanças da microflora e do pH cecal com a fisiopatologia da laminite poucas são as medidas profiláticas ou terapêuticas que visam restabelecer ou manter a função cecal. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração intracecal de solução tampão contendo hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio ($\text{Al}(\text{OH})_3$ e $\text{Mg}(\text{OH})_2$) na evolução da laminite induzida por sobrecarga de CHO balizado em parâmetros clínicos e laboratoriais; quantificando e qualificando aminas bioativas do conteúdo cecal; comparando número, tipo, localização e distribuição de células apoptóticas epidérmicas laminares e comparando a expressão gênica de MMP-2 e MMP-9 em tecido laminar digital. Os animais que desenvolveram laminite tiveram sinais de claudicação de ocorrência mais tardia no grupo que recebeu solução tampão, porém, ambos os grupos expostos ao CHO exibiram alterações laboratoriais características deste modelo experimental. As concentrações cecais da putrescina e cadaverina, o número de células epidérmicas laminares apoptóticas e a expressão gênica das MMP-2 e MMP-9 apresentaram-se elevadas nos eqüinos expostos à sobrecarga de CHO em relação aos do grupo controle, no entanto, foram menos evidentes no grupo tratado com solução tampão. Concluiu-se que a administração intracecal de solução tampão, embora não tenha suprimido as alterações clínicas, laboratoriais e metabólicas na laminite por sobrecarga de CHO, diminuiu a intensidade dos mesmos, indicando um efeito benéfico deste tratamento.

Palavras-chave: laminite, eqüino, tratamento, pH cecal, apoptose, MMP 2, MMP-9, aminas.

CECAL BUFFERING: CLINICAL, PHYSIOPATHOLOGIC AND THERAPEUTIC ASPECTS IN EXPERIMENTAL LAMINITIS IN EQUINE.

SUMMARY - A large number of studies have been undertaken aimed at furthering our understanding of the complex mechanisms of acute laminitis in the horse. Many of these studies have either reinforced or cast doubt on previously theories on the pathogenesis of this disease, while others have suggested new mechanisms which may play a key role in its development. Studies utilising in vitro and in vivo models of the disease, particularly addressing the areas of inflammation, haemodynamic disturbances and enzyme activation in the hoof, as well as the events occurring in the hindgut, have helped to explain many clinical observations of the disease. Instead of the existence of results linking the metabolic alterations, microflora and cecal pH changes with laminitis pathophysiology there are no effective therapies and means of prevention to reestablish or maintain the cecal function. The aim of this study was evaluate the effects of an intracecal buffer solution composed of aluminum and magnesium hydroxide on the development of carbohydrate overload (CHO)-induced laminitis by characterization and comparison of clinical parameters, bioactive amines in cecal content, apoptotic epidermal cells and gene expression of MMP-2 e MMP-9 in digital laminar tissues. All CHO-treated horses developed lamenesses, but it was significantly delayed in group that received buffering treatment. However, both CHO-treated group presented similar laboratorial changes which are particular to this experimental model. The cecal putrescine and cadaverine level, the number of laminar apoptotic epidermal cells, and gene expression of MMP-2 and MMP-9 were increased in CHO-treated horses compared to control group, but it was less in the buffer-treated group. It as concluded that intracecal buffer administration was effective in decrease the intensity of clinical, laboratorial and metabolic changes induced by carbohydrate overload, however, it was not prevented, indicating the possible therapeutic effect of this treatment.

Key words: laminitis, equine, treatment, cecal pH, apoptosis, MMP 2, MMP-9, amines.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO

A laminite é uma doença que há muitos séculos vem acometendo eqüinos e causando estresse emocional profundo além de perdas econômicas irreparáveis para criadores e treinadores devido à dor que os animais acometidos sentem, levando muitas vezes, a uma condição corpórea caquética e períodos prolongados de decúbito com conseqüente aparecimento de feridas de apoio.

Nos Estados Unidos, aproximadamente 75% dos eqüinos com laminite não retornam para a atividade atlética; desses, a maioria é submetida à eutanásia devido a dor severa associada a rotação e/ou deslocamento da falange distal, resultante da separação das lâminas dérmicas e epidérmicas (HUNT, 1993). Estima-se que 15% dos eqüinos são acometidos por laminite ao longo de suas vidas e 75% desses animais desenvolvem claudicação crônica ou severa e um estado debilitante necessitando, na maioria das vezes, de eutanásia, representando uma grande perda desses animais ao redor do mundo causada por esta doença devastadora (STOKES, 2002).

O relato mais antigo dessa enfermidade foi feito por Aristóteles por volta de 350 a.C. quando a denominou “Doença da Cevada” (WAGNER & HEYMERING, 1999). Durante o século IV, o grego *Apsyrtus*, por ordem do Imperador Constantino, escreveu um livro intitulado “*Hippiatrika*” (Medicina Eqüina), onde descreveu um tratamento para a referida doença, consistindo em sangramento moderado, exercício leve e restrição alimentar. Desde então, inúmeros nomes e etiologias foram e ainda são relacionados à laminite, e vários tratamentos - desde “sangramento dos humores ruins” até o desenvolvimento de pomadas especiais para aplicação tópica no casco - já foram empregados (ALLEN, 2004).

O termo “afundamento” (do inglês *founder*) apareceu durante o século XVI, derivado da palavra *morfounde*, usada por marinheiros para descrever quando um navio é direcionado para o fundo da água por uma sucessão de ondas, algo parecido com o afundamento da falange distal dentro da cápsula do casco (DUNLOP & WILLIAMS, 1996). O termo laminite aborda a localização precisa da doença dentro do

casco que passou a ser melhor compreendida a partir do início do século XVIII (SMITH, 1919).

A laminite aguda é uma doença que acomete tanto a lâmina dérmica quanto a lâmina epidérmica do casco do equino. Esta afecção severamente debilitante e altamente dolorosa é potencialmente ameaçadora para a carreira esportiva do animal, pondo em risco sua vida. O fato de afetar tanto equinos quanto pôneis adultos indiscriminadamente, de qualquer raça ou uso, faz com que essa enfermidade seja de extrema importância para proprietários, treinadores e entusiastas da prática eqüestre (ALLEN, 2004).

Normalmente, a ocorrência da laminite é secundária a outras alterações tais como: doenças agudas do trato gastrointestinal, particularmente obstruções estrangulativas e doenças intestinais inflamatórias; sobrecarga de grãos; retenção de placenta seguida de metrite; pleuropneumonia e outras doenças usualmente acompanhadas por quadros endotoxêmicos (MOORE et al., 1989). Também pode ocorrer devido a sobrecarga ou peso excessivo no membro contralateral em equinos que apresentam claudicação severa na qual não conseguem apoiar o peso sobre o membro acometido (PELOSO et al., 1996).

Nos EUA, o custo anual de diagnóstico e tratamento da laminite é estimado em aproximadamente U\$ 8 milhões e a perda monetária de animais subsequente a complicações da doença também chega a milhões de dólares a cada ano (STOKES, 2002).

Assim, com esse estudo buscou-se acrescentar ao universo do complexo processo fisiopatológico da laminite induzida por sobrecarga de carboidrato (CHO), novas informações para minimizar a gravidade, além do propósito adicional de instituir alternativa terapêutica para o tratamento dessa síndrome. Dessa maneira objetivou-se:

1. Caracterizar e comparar o desenvolvimento clínico da laminite induzida por sobrecarga de CHO após a administração de solução tampão composta de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e $\text{Mg}(\text{OH})_2$ por via intracecal;
2. Caracterizar e comparar os parâmetros laboratoriais da laminite induzida por sobrecarga de CHO, após a administração de solução tampão composta de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e $\text{Mg}(\text{OH})_2$ por via intracecal;

3. Qualificar e quantificar as aminos bioativas do conteúdo cecal de eqüinos com laminite experimental induzida por sobrecarga de CHO, tratados ou não com solução tampão;
4. Comparar o número, tipo, localização e distribuição das células epidérmicas laminares apoptóticas em eqüinos com laminite experimental induzida por sobrecarga de CHO, tratados ou não com solução tampão;
5. Comparar a expressão gênica das enzimas metaloproteinase-2 e -9 (MMP-2 e MMP-9) em tecido laminar de eqüinos clinicamente sadios e daqueles com laminite induzida por sobrecarga de CHO, tratados ou não com solução tampão.

Desta maneira, serão aqui apresentados, em forma de capítulos, os estudos realizados para atingirem-se os objetivos propostos, a saber:

Capítulo 2: Influência do $Mg(OH)_2$ e do $Al(OH)_3$ sobre os sinais clínicos e aspectos hematológicos e bioquímicos e líquido peritoneal de eqüinos com laminite induzida experimentalmente por sobrecarga de carboidrato.

Capítulo 3: Quantificação das aminos bioativas em conteúdo cecal de eqüinos com laminite experimental.

Capítulo 4: Apoptose de células epidérmicas laminares na laminite induzida por sobrecarga de carboidrato, após tamponamento cecal, em eqüinos.

Capítulo 5: Transcrição das enzimas metaloproteinase-2 e -9 (MMP-2 e MMP-9) em eqüinos com laminite induzida por sobrecarga de carboidrato, tratados ou não com solução tampão.

1.2. REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1. Anatomia do Dígito

Apesar da aparência simples, o dígito oferece apoio extremamente forte para o equino. Os ossos do dígito compreendem as falanges proximal, média e distal e o sesamóide distal ou osso navicular (Fig. 1). A principal articulação é a interfalangeana distal composta pela falange média, falange distal e pelo sesamóide distal (MOORE, 1989).

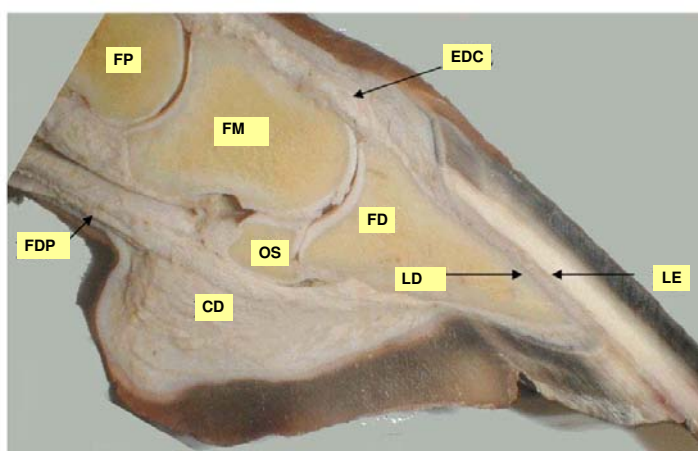


Figura 1 - Corte longitudinal do casco eqüino. FP = falange proximal, FM = falange média, FD = falange distal OS = osso sesamóide distal, CD = coxim digital, FDP = tendão flexor digital profundo, EDC = tendão extensor longo da falange, LD = lâmina dérmica e LE = lâmina epidérmica (adaptado de STOKES, 2002).

Várias estruturas de tecido mole estão envolvidas na arquitetura e manutenção da integridade das articulações do dígito, entre elas ligamentos, cartilagens, tendões, nervos e vasos sanguíneos, a saber:

a) Ligamentos colaterais curtos unem a porção distal da falange média e as bordas proximais da falange distal. Os ligamentos sesamoideanos colaterais estendem-se da porção distal da falange proximal e inserem-se nas bordas distais do sesamóide distal. Os ramos destes ligamentos também se inserem no processo palmar da falange distal. O ligamento ímpar do sesamóide distal origina-se no aspecto distal deste

sesamóide e estende-se até a superfície distal da falange. O tendão extensor longo da falange insere-se no processo extensor da falange distal (Fig. 2) (KAINER, 1989; RIEGEL & HAKOLA, 1997).

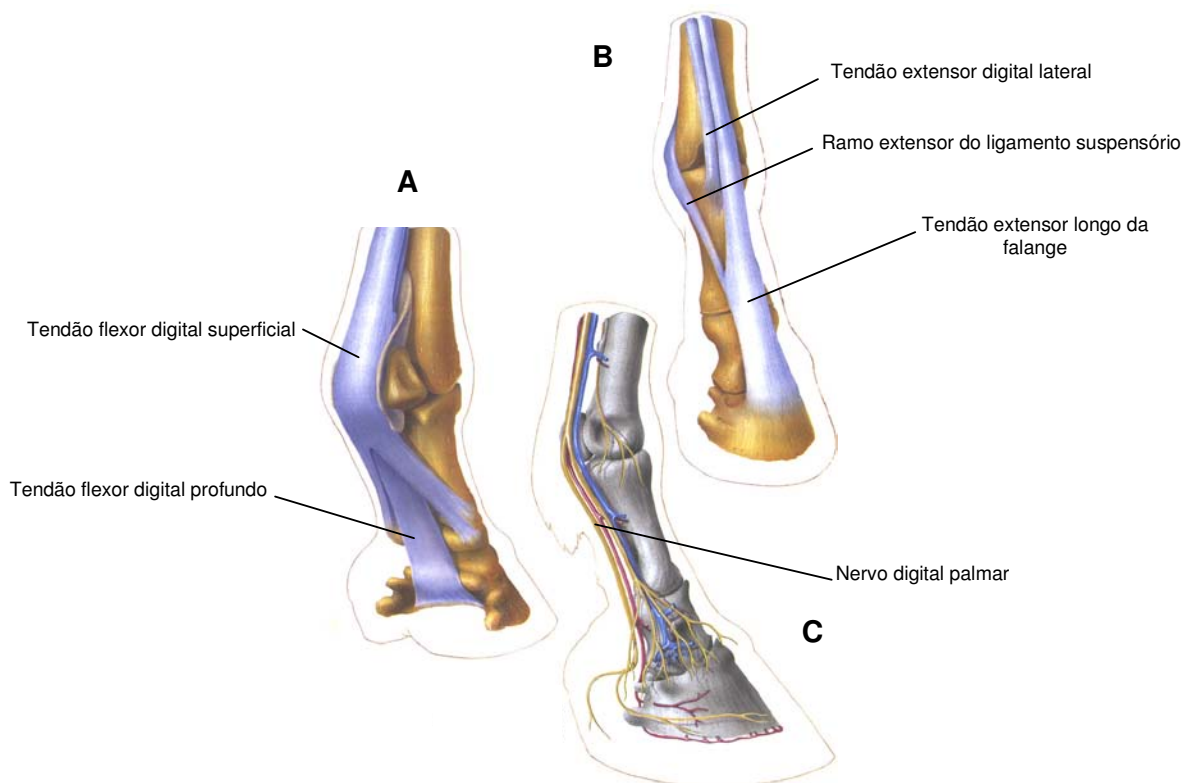


Figura 2 – Representação esquemática de: A. Tendões flexores; B. Tendões extensores; C. Suprimento nervoso (adaptado de MOORE & ALLEN, 1995)

b) A cápsula da articulação interfalangeana distal une-se ao tendão extensor digital comum, aos ligamentos colaterais da articulação interfalangeana distal, ao ligamento ímpar do sesamóide distal e ao ligamento terminal. Existem duas bolsas sinoviais principais na cápsula articular, a bolsa dorsal e a palmar. A bolsa palmar é dividida em bolsa proximal e distal (KAINER, 1989).

c) Duas estruturas cartilaginosas, localizadas no aspecto palmar dos ligamentos colaterais, compostas por cartilagem hialina estão presentes. À medida que o animal envelhece, essas cartilagens se transformam, predominantemente, em fibrocartilagem. O coxim digital é uma grande estrutura de tecido mole localizada entre a base das

cartilagens, composto por tecidos fibroelástico, adiposo e pequena porcentagem de fibrocartilagem. Dentro do coxim digital também se localiza um plexo venoso (KAINER, 1989). Conforme ocorrem as flutuações no apoio do peso sobre o dígito, tanto ao passo quanto ao trote ou galope, o coxim digital é comprimido forçando o retorno do sangue do plexo venoso do dígito para o coração. Esta compressão do coxim digital parece atuar como um amortecedor para o casco (PELOSO et al., 1996).

d) Inervação derivada principalmente dos nervos digitais palmares medial e lateral (Fig. 2). Um ramo dorsal e, em aproximadamente 30% dos eqüinos, um ramo intermediário, suprem a inervação sensorial e vasomotora do aspecto dorsal da articulação interfalangeana distal e do cório perióplico e laminar (KAINER, 1989). O nervo digital palmar continua distalmente para suprir o cório laminar e solar (SACK, 1975; SCOTT et al., 1976; KAINER, 1989; BOWKER et al., 1993; MOLYNEUX et al., 1994; CRIPP & EUSTACE, 1999; HOFFMANN et al., 1999; ROSENSTEIN et al., 2000).

e) Suprimento arterial do membro torácico derivado principalmente das artérias digitais palmares medial e lateral (Fig. 3 e 4). O primeiro ramo da artéria digital na articulação interfalangeana distal, é a artéria bulbar que supre o coxim digital e de onde deriva o ramo axial que supre a lâmina da sola e a barra da sola (KAINER, 1989). A artéria coronária é outro ramo da artéria digital palmar e supre o cório coronário e perióplico. A artéria dorsal da falange média, outro ramo da artéria digital palmar, forma a artéria coronária circular com o vaso contralateral. A artéria coronária e a artéria coronária circular suprem a pele, a inserção do tendão extensor, a articulação interfalangeana distal e o cório coronário. O arco colateral, na altura da falange média, é formado pela artéria palmar da falange média, um ramo da artéria digital palmar. Este ramo supre o osso sesamóide distal, a articulação interfalangeana distal, o coxim digital e o cório cuneato. Da artéria digital palmar deriva a artéria dorsal da falange distal, na falange distal, que supre o coxim digital e de onde derivam os ramos da artéria circunflexa e o arco terminal. Essas estruturas suprem o osso sesamóide distal, o cório laminar, solar e cuneato (Fig.3). O sentido do fluxo sangüíneo dentro da lâmina é distal para proximal (KAINER, 1989).

As anastomoses arteriovenosas ocorrem na derme do bordo coronário, em estruturas neurovasculares dentro da lâmina dérmica e na entrada e ao longo do

comprimento da lâmina dérmica (POLLITT & MOLYNEUX, 1990; MOLYNEUX et al., 1994). A densidade de anastomoses arteriovenosas dentro da lâmina é em torno de 500 anastomoses/cm² (POLLITT & MOLYNEUX, 1990). Existem várias hipóteses para a função dessas anastomoses: uma delas seria a da termorregulação, onde durante períodos longos de exposição ao frio (por exemplo, ficar em pé na neve), as anastomoses abrem-se para permitir o aquecimento do casco por aumento do fluxo sanguíneo. Outra hipótese seria que as flutuações de pressão (por exemplo, a pressão aumentada no casco devido ao galope ou salto) causariam a abertura das anastomoses para redistribuir o aumento na pressão, agindo como uma válvula de segurança para a vasculatura (POLLITT & MOLYNEUX, 1990).

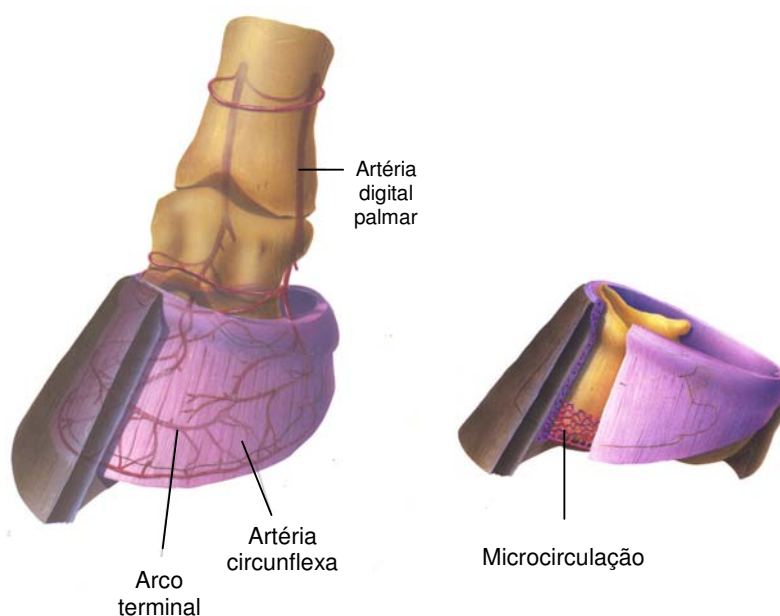


Figura 3 – Representação esquemática do suprimento sanguíneo do casco equino. (adaptado de MOORE & ALLEN, 1995)

f) As estruturas mais internas do casco e o osso sesamóide distal são drenados pelas veias paralelas axial e abaxial dentro do canal solar da falange distal (KAINER, 1989). As veias paralelas unem-se para formar as veias terminais, que por sua vez são unidas pelos ramos venosos internos do plexo venoso, formando a veia digital palmar. Uma anastomose entre as veias digitais palmares, localizada na superfície da falange

média, drena o sangue do osso sesamóide distal e do coxim digital. A maioria das veias do dígito não possui válvulas e a direção de seus fluxos é dependente das forças de apoio do peso (KAINER, 1989). É provável que devido à conformação anatômica do membro torácico e à força requerida para o retorno venoso ao coração, as veias digitais possuam a camada muscular diferenciada, quando comparadas com veias de outros tecidos e de outras espécies (ALLEN et al., 1988a).

A capacidade de locomoção do eqüino depende da integridade das lâminas interdigitais primárias e secundárias, que unem estruturalmente a muralha do casco, a falange distal e a sola do casco em uma unidade singular (HOOD, 1999b). A estrutura do casco é composta pelo extrato médio constituído por epitélio escamoso avascular altamente queratinizado. Esta camada combina-se com o extrato interno composto pelas lâminas epidérmicas primárias e secundárias. Existem, aproximadamente, 600 lâminas primárias formando sulcos longitudinais por meio de interdigitações com a lâmina vascular do cório laminar. O cório laminar se une com a subcutis e o perióstio da falange distal (KAINER, 1989).

A microcirculação da região laminar é composta por artérias e veias parietais de maior calibre e suas respectivas vias de ligação. Essas vias são compostas pelas artérias axiais que se originam das artérias parietais e correm em direção aos ápices das lâminas dérmicas primárias. Adicionalmente, para suprir as arteríolas interligadas, capilares e anastomoses arteriovenosas, as artérias axiais se conectam umas às outras, próximo aos ápices das lâminas dérmicas primárias para formar uma alça arterial periférica. A porção venosa da microcirculação é composta de pequenas veias de ligação, veias marginais nos ápices das lâminas primárias dérmicas e veias coletoras na base das lâminas primárias dérmicas. As anastomoses arteriovenosas são de particular interesse sendo mais numerosas e de maior calibre próximas ao ápice das lâminas do que em qualquer outra região laminar (Fig. 4) (POLLITT & MOLYNEUX, 1990).

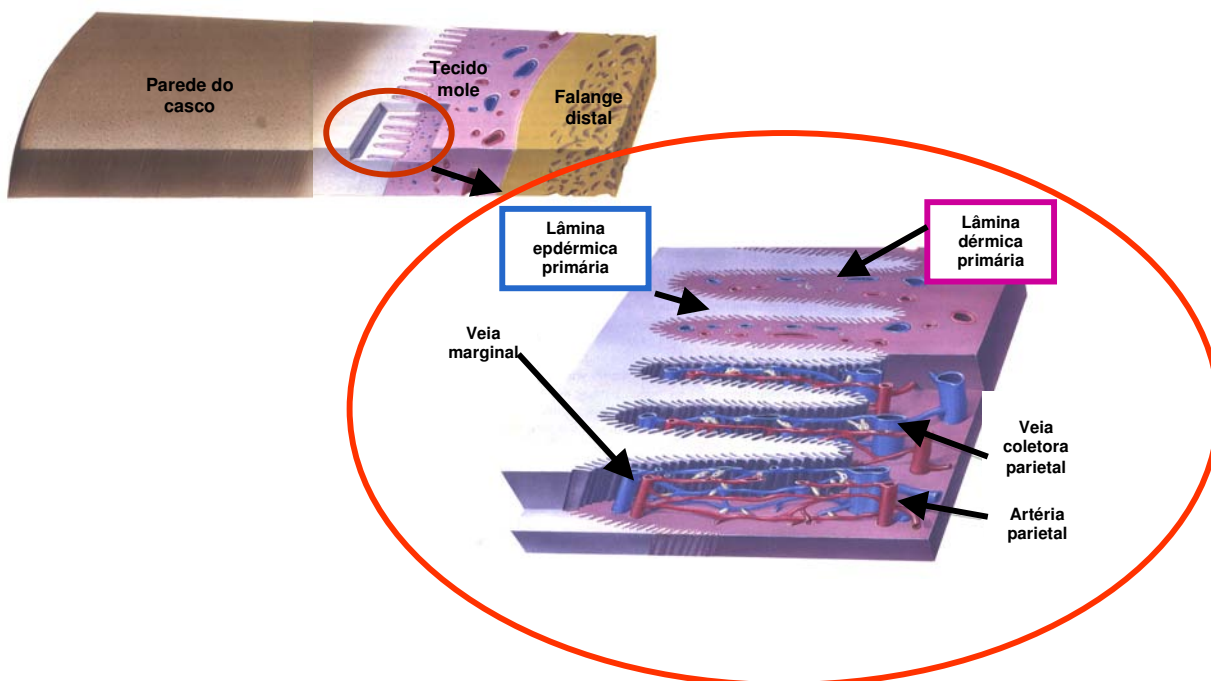


Figura 4 – Representação esquemática de um corte longitudinal, mostrando a muralha do casco, tecido laminar, falange distal, a área onde as lâminas dérmicas e epidérmicas se interdigitam e a microcirculação na região laminar do casco eqüino (adaptado de MOORE & ALLEN, 1995).

1.2.2. Dinâmica da Circulação Digital

Um equino saudável apóia, aproximadamente, 28% de seu peso em cada membro torácico e 22% em cada membro pélvico (HOOD et al., 1997). Em um animal em posição quadrupedal, o fluxo sanguíneo digital é relativamente estável, e pequenas alterações no peso, quando o equino troca o apoio, diminuem ou aumentam o fluxo, sem maiores implicações (HUNT et al., 1994).

Cinco forças principais são exercidas sobre o dígito quando o animal encontra-se em posição quadrupedal sendo predominantes, em ordem de importância: (1) pressão compressiva devido à massa corporal do animal; (2) força de tensão do estiramento do tendão flexor digital profundo; (3) força de tensão do estiramento da lâmina interdigital da muralha do casco (interface laminar); (4) força de tensão do estiramento do tendão extensor digital e (5) força compressiva da sola no chão (HOOD, 1999a).

A pressão venosa digital aumenta de acordo com o aumento da pressão aplicada sobre o dígito e diminui com a diminuição dessa pressão agindo, possivelmente, como amortecedor (RATZLAFF et al., 1985). O coxim digital também parece agir como amortecedor durante a locomoção diminuindo essa pressão (BOWKER et al., 1998). Além disso, as forças aplicadas nas interdigitações das lâminas dérmicas e epidérmicas são substanciais e a ruptura ou interferência na fixação desses tecidos podem levar a falência ou colapso da falange distal dentro da cápsula do casco.

As veias digitais que drenam o casco possuem uma característica única, ou seja, a parede com musculatura altamente desenvolvida e relativamente sem elasticidade. Estão localizadas em um compartimento não complacente, resultando em uma circulação de baixa complacência (ALLEN et al., 1988a). As artérias e veias digitais do eqüino são altamente sensíveis a substâncias vasoconstritoras, mais notadamente noradrenalina e endotelina (BAXTER et al., 1989a).

Acima de tudo, os efeitos de baixa complacência e alta sensibilidade às substâncias vasoconstritoras predispõem o casco eqüino a pressões venosas elevadas aumentando, dessa maneira, a pressão hidrostática e conseqüentemente a probabilidade de formação de edema laminar.

Em tecidos normais, os três principais fatores de segurança que contra-atacam a formação do edema são: a permeabilidade capilar, a resistência pré e pós-capilar e a drenagem linfática.

A impermeabilidade do endotélio capilar serve como barreira para a transudação de líquido e proteínas, resultando em gradiente mais alto entre a pressão oncótica capilar e a pressão oncótica tecidual, favorecendo o movimento do líquido para o lúmen capilar. Porém, o leito capilar do casco eqüino retém somente 67% das macromoléculas dentro da circulação, sendo mais permeável que a vasculatura da pata do cão e do rato (ALLEN et al., 1990). Porém, o leito capilar digital eqüino, avaliado por meio de bomba de perfusão digital extracorpórea para medir as forças de Starling dentro do casco, mostrou-se altamente permeável ao líquido e a macromoléculas (Fig.5) (ALLEN et al., 1988a). Isso resulta em concentração maior de proteína intersticial, e conseqüentemente, um aumento da pressão oncótica tecidual, favorecendo a formação do edema.

A resistência pré-capilar alta associada à resistência pós-capilar baixa (92% e 8%, respectivamente) reduz a pressão capilar e, conseqüentemente, a pressão hidrostática para a filtração transciliar. A proporção na resistência pré e pós-capilar em um equino saudável é comparável à de qualquer outro leito capilar de tecidos de outras espécies (ALLEN et al., 1988b).

O terceiro fator de segurança para o edema é representado pela drenagem linfática. O número e diâmetro reduzidos dos vasos linfáticos do casco tornam improvável que a circulação linfática possa funcionar eficientemente contra o edema, quando as forças hidrostáticas no capilar favorecerem a sua formação (ALLEN et al., 1990).

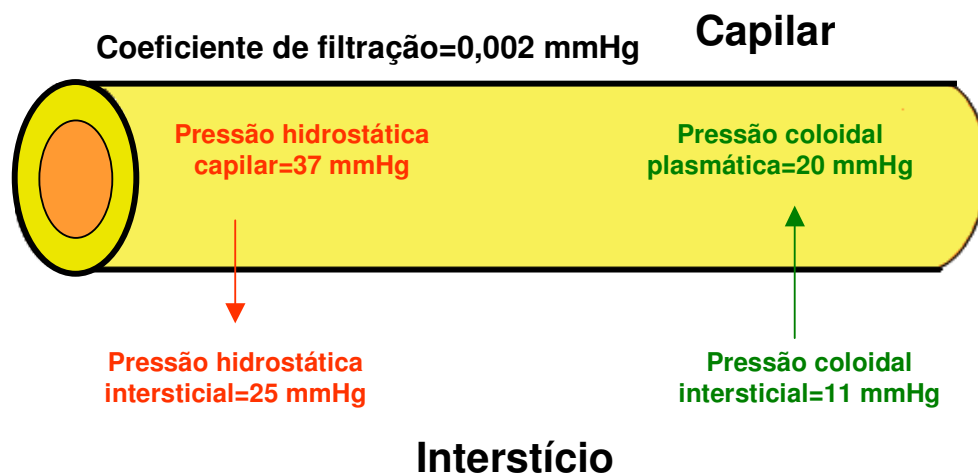


Figura 5 - Diagrama representando as medidas das forças de Starling da circulação digital de eqüinos saudáveis usando bomba de perfusão em preparação digital extra-corpórea (adaptado de ALLEN et al., 1990).

1.2.3. Laminite

1.2.3.a. Introdução

Vários estudos vêm sendo realizados para melhorar a habilidade dos clínicos em identificar eqüinos com alto risco para o desenvolvimento de laminite. DORN et al. (1975) observaram, em estudos com eqüinos acometidos por laminite, que a ocorrência da doença foi maior em garanhões do que em machos castrados, indicando que fatores hormonais podem ser importantes na patogênese da doença. Ainda nesse mesmo estudo, houve uma associação sazonal com o desenvolvimento da laminite na população avaliada. ALFORD et al. (2001) observaram maior susceptibilidade de éguas para o desenvolvimento de laminite aguda do que machos castrados ou garanhões. Eles também notaram risco maior para o desenvolvimento de laminite aguda em eqüinos com idade entre cinco e seis anos e entre 13 e 31 anos. Entretanto, outros pesquisadores não encontraram correlação entre sexo e sazonalidade para a ocorrência de laminite aguda (SLATER et al., 1995; POLZER & SLATER, 1997).

Na maioria das vezes, a laminite está associada a outras doenças tais como cólica, particularmente aquelas decorrentes de obstruções estrangulantes e doenças gastrintestinais inflamatórias; sobrecarga de grãos; retenção de placenta com subsequente metrite; pleuropneumonia e outras doenças associadas à endotoxemia (HUNT et al., 1986; COHEN et al., 1994). Um estudo conduzido nos EUA envolvendo sete clínicas particulares e um hospital veterinário universitário demonstrou que as doenças do trato gastrintestinal foram a causa primária mais comum em 54% dos eqüinos que desenvolveram laminite aguda (POLZER & SLATER, 1997).

A laminite é uma doença que pode afetar os quatro membros dos eqüinos, entretanto os membros torácicos são mais comumente afetados, uma vez que dão apoio a aproximadamente 60% da massa corporal desses animais (HOOD, 1999a). Pode também ocorrer no membro contralateral de animais que têm claudicação severa causada por lesões que impossibilitam o apoio do peso no membro acometido (PELOSO et al., 1996).

1.2.3.b. Fisiopatogenia da laminite

Existem três teorias principais a respeito dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da laminite: a vascular, a traumática e a metabólica (HOOD, 1999c).

1.2.3.b.a. Teoria Vascular

Essa teoria postula que a alteração da perfusão digital seja o fator iniciador da cascata de eventos que leva à disfunção metabólica e falência estrutural da lâmina do casco (HOOD et al., 1993). Apesar da fisiopatologia da laminite não ser compreendida em sua totalidade, os mecanismos vasculares iniciais são caracterizados por hipoperfusão devido à vasoconstrição, formação de edema vascular, abertura de anastomoses arteriovenosas permitindo que o sangue atravesse os tecidos laminares, causando isquemia tecidual, necrose da lâmina interdigital e, por último, falência mecânica com rotação ou afundamento da falange distal em direção à sola (GARNER et al., 1975a; ROBINSON et al., 1976; HOOD et al., 1978; ALLEN et al., 1990).

A venoconstrição é considerada o fator iniciador causando diminuição da perfusão laminar (MOORE et al., 1989). A vasoconstrição resulta em aumento da resistência vascular e da pressão hidrostática capilar que, por sua vez, força o extravasamento vascular nos capilares em direção ao intestício aumentando, dessa maneira, a pressão laminar intersticial. Quando a pressão tecidual aumenta acima da pressão crítica de fechamento do capilar, ocorre o colapso dos capilares favorecendo a isquemia tecidual. A pressão aumentada em um espaço confinado anatomicamente pode afetar o fluxo sangüíneo desses tecidos, podendo levar a isquemia, condição conhecida como “síndrome compartimental”.

ALLEN et al. (1990) levantaram a hipótese de que os eqüinos desenvolvem a síndrome compartimental no casco durante os estágios prodrômicos da laminite, levando à isquemia laminar. Essa redução do fluxo sangüíneo seria devido à abertura das anastomoses arteriovenosas na altura da banda coronária (ALLEN et al., 1990; MOORE et al., 1989; HUNT, 1991). A lâmina digital entra em processo de necrose depois de isquemia prolongada, causando separação das interdigitações das lâminas dérmica e epidérmica, rotação e deslocamento distal da falange distal (BAXTER, 1986).

A síndrome de Raynaud, de ocorrência em humanos, apresenta muitas similaridades com a laminite eqüina, tais como: isquemia precoce devido à diminuição da perfusão microcirculatória digital seguida por reperfusão, dor intensa e aumento da pulsação digital. Tem sido proposto que a síndrome de Raynaud e a laminite sejam a mesma doença, mas em espécies diferentes (HOOD et al., 1990; ZAMORA et al., 1990; KATWA et al., 1999). A doença de Raynaud é definida como cianose bilateral proximal idiopática dos dígitos devido à contração arterial e arteriolar. Muitas vezes, este processo é precipitado pelo frio e resulta em palidez e adormecimento ou dor nos dígitos (WILLIAMS & WILKINS, 1995).

Em pacientes com doença de Raynaud, a expressão gênica e as concentrações plasmáticas de endotelina-1 (ET-1) na vasculatura cutânea estão aumentadas (DOWD et al., 1990; HOOD et al., 1990; ZAMORA et al., 1990; KATWA et al., 1999). Hipotetiza-se que o vasoespasmo associado com a doença seja devido à disfunção endotelial por produção excessiva de ET-1 e diminuição da produção de óxido nítrico (NO) (CIMMINIELO et al., 1991).

A hipótese vascular tem focado as alterações hemodinâmicas digitais, entretanto o mediador ou mediadores responsáveis por essas alterações vasculares ainda não foi estabelecido. KATWA et al. (1999) demonstraram que a concentração de ET-1, um vasoconstritor potente derivado do endotélio, no tecido conectivo laminar obtido de eqüinos com laminite aguda experimental e de eqüinos com laminite clínica, estava aumentada em relação ao grupo controle.

Estudos examinando a resposta *in vitro* à ET-1 demonstraram que a contração das veias digitais palmares eqüinas foi três vezes maior do que nas artérias (BAXTER et al., 1989a; VENUGOPAL et al., 2001; STOKES et al., 2002a; STOKES et al., 2002b). Pesquisas anteriores demonstraram que a administração de doadores de NO melhora a perfusão digital e reduz a pulsação digital associada com a laminite aguda, em pôneis (HINCLEY et al., 1996a; HINCLEY et al., 1996b). O NO é um vasodilatador derivado do endotélio que desempenha papel importante na regulação da liberação de ET-1 (RUBANYI & POLOKOFF, 1994). Baseado nesses estudos é possível concluir que um desbalanço das substâncias endógenas derivadas do endotélio, tais como ET-1 e NO,

pode desempenhar papel chave nas alterações vasculares que ocorrem durante o desenvolvimento da laminite em eqüinos.

1.2.3.b.b. Teoria Traumática

A teoria traumática ou mecânica está fundamentada nas causas de laminite que resultam de trauma direto no casco e não numa doença primária sistêmica, levando ao desenvolvimento da laminite (HOOD, 1999c). Exemplos comuns de laminite causada traumáticamente são: laminite de endurecimento, laminite secundária no membro adjacente a claudicação unilateral (laminite de apoio), e desenvolvimento de laminite após longas viagens em trailers (PELOSO et al., 1996; HOOD, 1999c).

O mecanismo exato que leva à falência estrutural da lâmina é desconhecido, no entanto muitas hipóteses têm sido levantadas. A força excessiva aplicada sobre as interdigitações das lâminas dérmica e epidérmica pode iniciar uma resposta inflamatória com vasoespasmo, aumentando, com isso, a pressão capilar hidrostática e levando à formação de edema, o que resulta em uma situação similar à síndrome compartimental, muito parecida com aquela que ocorre na teoria vascular.

Outra hipótese é a de que a aplicação de força excessiva resulta em enfraquecimento das interdigitações das lâminas dérmica e epidérmica, resultando em resposta inflamatória e/ou vasoespasmo levando a injúria isquêmica das interdigitações laminares (HOOD, 1999c).

1.2.3.b.c. Teoria Enzimática

A teoria enzimática postula que o evento fundamental causador da falência das interdigitações laminares é a chegada de toxinas através do sangue até a lâmina epidérmica, resultando em enfraquecimento e perda da fixação celular (POLLITT, 1999). Segundo essa teoria, a perda dessas fixações celulares é o evento precursor para as alterações vasculares e inflamatórias descritas na teoria vascular.

POLLITT & DAVIES (1998) afirmam que a hiperperusão do casco é responsável pela chegada dessas toxinas nos tecidos, ao invés da hipoperusão demonstrada pelos proponentes da teoria vascular. Eles defendem que os alvos das toxinas transportadas pelo sangue são os mediadores da remodelação enzimática que fazem parte de

processos normais no movimento contínuo de proliferação da muralha do casco na falange distal.

A laminina e o colágeno dos tipos IV e VII são componentes da membrana laminar basal e acredita-se que as MMP-2 e MMP-9 dissolvam essas substâncias. Sob estados fisiológicos normais, essa dissolução controlada permite o movimento da lâmina epidérmica sobre a lâmina dérmica à medida que ocorre o crescimento do casco (POLLITT & DAVIES, 1998; POLLITT, 1999). A ativação excessiva dessas enzimas levaria à dissolução descontrolada dos constituintes da membrana, resultando em separação da lâmina epidérmica da lâmina dérmica.

Amostras de tecido laminar de eqüinos, obtidas 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO, evidenciaram perda da fixação da membrana basal (POLLITT, 1999, SAMPAIO, 2003). Em eqüinos com laminite aguda clínica ou laminite crônica, a zimografia dos tecidos conectivos laminares detectou aumento da ativação de MMP extracelular comparado com eqüinos sadios (JOHNSON et al., 1998). Acredita-se que ativação das enzimas MMP seja induzida por exotoxinas de espécies bacterianas de *Streptococcus*, especialmente *Streptococcus bovis*, uma bactéria Gram-positiva que faz parte da microflora cecal normal (GARNER et al., 1978; POLLITT, 1999; MUNGALL et al., 2001).

Utilizando o modelo de sobrecarga por CHO, foram identificadas alterações na população bacteriana cecal devido à fermentação do CHO, resultando em produção excessiva de lactato, declínio rápido no pH intracecal e morte de bactérias cecais, incluindo espécies de *Streptococcus* (GARNER et al., 1977; GARNER et al., 1978). Baseado nessa teoria e sustentado nos resultados, a prevenção da laminite poderia visar à supressão da ativação das enzimas responsáveis pela dissolução da membrana basal. Já foi postulado que o desenvolvimento da laminite aguda, na maioria dos casos, ocorre secundariamente a outras doenças primárias, portanto, os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da laminite são provavelmente muito numerosos, complexos e inter-relacionados.

1.2.3.b.d. Teoria Endócrina

A teoria endócrina baseia-se na associação da laminite com vários distúrbios do sistema endócrino do eqüino, sendo que para esses casos de laminite tem-se utilizado o termo laminite endocrinopática (JOHNSON, 2004). Os distúrbios endocrinológico que provavelmente podem predispor à laminite são aqueles associados com o excesso de glicocorticóides (GC) (JOHNSON et al., 2002) e com resistência à insulina (JOHNSON, 2002). Visto que os glicocorticóides causam a resistência à insulina e que a resistência à insulina crônica pode, eventualmente predispor a glândula pituitária de eqüinos à doença de Cushing, pode-se considerar que essas duas categorias possam estar relacionadas.

O risco da ocorrência da laminite representa uma dos mais importantes complicações quando do uso de glicocorticóides sintéticos em eqüinos. No entanto, apesar das várias tentativas em se induzir laminite experimental, parece que o desenvolvimento dessa afecção após a administração de GC é imprevisível.

Parece que a ação do excesso de GC após meses de utilização leva a alterações estruturais que enfraquecem a junção do tecido laminar com o casco, predispondo dessa maneira, à laminite por alguma outra razão já conhecida (JOHNSON et al., 2002). Em cavalos que já apresentam uma fraqueza da interdigitação laminar, o tratamento com GC pode precipitar a ocorrência da laminite em um espaço de tempo relativamente curto, dando a impressão que a laminite ocorreu devido ao tratamento recente. Os GC exercem numerosas ações que poderiam contribuir potencial e teoricamente para a patogênese da laminite, incluindo seus efeitos sobre os vasos sanguíneos, o tegumento, o trato gastrointestinal, sua ação sobre a insulina e sobre a composição da gordura corpórea.

Dessa maneira, os GC afetam a perfusão tecidual por meio de ação direta sobre a musculature lisa vascular e indiretamente por causar resistência à insulina. Tanto a betametasona quanto a hidrocortisona são capazes de potencializar as ações vasoconstritoras das catecolaminas adrenalina, noradrenalina e serotonina em vasos digitais calibrosos. No entanto, se esse efeito é suficiente para explicar o desenvolvimento da laminite em face do excesso de GC é atualmente desconhecido (EYRE et al., 1979). JOHNSON et al. (2003) sugeriram que o tratamento com

dexametasona afeta as células da musculatura lisa vascular de forma a aumentar a contratilidade, contribuindo potencialmente para a redução do fluxo sanguíneo.

Da mesma maneira que os GC causam atrofia na pele, a laminite pode ser resultante da fraqueza laminar induzida pelos GC devido ao catabolismo protéico aumentado. A fixação entre o tecido laminar e o casco é altamente dinâmica sendo constantemente remodelada para atender a necessidade de crescimento do tecido. Mecanismos fisiológicos reparadores, incluindo o crescimento de fibroblastos e a biossíntese de colágeno, são inibidos pelos GC e podem predispor a laminite (MCCOY et al., 1980; BITAR, 2000).

Tanto a administração de dexametasona quanto o aumento da liberação de GC endógeno em momentos de estresse aumentam a permeabilidade da mucosa gastrointestinal de animais de laboratório (DAVIES et al., 1994; KIZILTAS et al., 1998; MEDDINGS & SWAIN, 2000; SODERHOLM & PERDUE, 2001). O estresse associado ao aumento da permeabilidade mucosa gastrointestinal em humanos facilita a absorção de antígenos, toxinas e outras moléculas pró-inflamatórias pelo lúmen intestinal (SODERHOLM & PERDUE, 2001). Em eqüinos, a laminite, muitas vezes, ocorre secundária a doenças do trato gastrintestinal, sugerindo que fatores tóxicos de origem intestinal podem desempenhar papel importante na patogênese dessa afecção (POLLITT & DAVIES, 1998).

Níveis altos de GC também podem interferir com a ação da insulina, levando à intolerância à insulina, um componente clínico comum a cavalos afetados pelo excesso de GC (Schott, 2002; Seckl et al., 2004). A intolerância à insulina crônica, caracterizada por hiperglicemia e hiperinsulinemia, sujeita células que não são dependentes de insulina a níveis de glicose relativamente altos (HSUEH & LAW, 1998). Este efeito tóxico da glicose é especialmente impotante para as células endoteliais, levando a um quadro denominado endoteliopatia glucotóxica; caracterizada pelo aumento da produção de endotelina-1 e redução da liberação de NO pelas células endoteliais (COSENTINO & LUSHER, 1998). Dessa maneira, a produção de fatores constrictores pelo musculatura lisa vascular seria outro potencial fator que poderia predispor as alterações na perfusão e o risco da laminite.

Os GC estimulam ainda, a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros. A síndrome de Cushing é caracterizada pelo aumento tanto da obesidade intra-abdominal quanto da gordura subcutânea (SCHOTT, 2002). As populações de adipócitos intra-abdominais aumentadas produzem hormônios tais como a resistina e a leptina, em uma quantidade maior que os adipócitos localizados no subcutâneo, contribuindo para a resistência à insulina (CHALDAKOV et al., 2003). Dessa forma, GC age tanto direta como indiretamente, aumentando o acúmulo dos adipócitos abdominais, promovendo resistência à insulina.

A gordura não é, como se acreditava anteriormente, simplesmente um repositório benigno de energia armazenada. Os adipócitos representam uma importante fonte de um número diverso de hormônios que desempenham papel importante na regulação da massa corporal e da composição do corpo (CHALDAKOV et al., 2003). Além do mais, é claro que populações heterogêneas de adipócitos produzem níveis diferenciados de vários adipocinas. Por exemplo, em humanos os adipócitos intrabdominais são endocrinologicamente mais ativos que os subcutâneos e por isso, estão associados com um risco maior para a doença cardiovascular (BUJALASKA et al., 1997). Existem diferenças entre as diferentes raças de cavalo com respeito à facilidade com a qual um estado obeso pode ser alcançado e mantido. Por exemplo, comparado com raças de cavalo, raças de pônei são tanto mais resistentes à insulina como relativamente mais suscetíveis à laminitis (FIELD & JEFFCOTT, 1989; MESSER et al., 2001). O crescimento dos adipócitos é conseguido pela produção de quantidades excessivas de sinais endócrinos, incluindo leptina, resistina, adiponectina, fatores liberadores de mineralocorticóide e citocinas pró-inflamatórias (CORRY & TUCK, 2001; CHALDAKOV et al., 2003; EHRHART-BORNSTEIN et al., 2003).

Acredita-se que condições associadas com o excesso de GC endógeno ou exógeno e a resistência à insulina levam a alterações no tecido conectivo da zona juncional entre o casco e o tecido laminar visto como um efeito de enfraquecimento da interface de fixação. Com o tempo, essas alterações resultam em alongamento das lâminas dérmicas primárias e secundárias, não necessariamente associado com dor, inflamação ou claudicação *per se* (JOHNSON, 2002). As características do casco afetado incluem alargamento progressivo das linhas de crescimento, divergência palmar

dessas linhas e alargamento da região da linha branca. O exame radiográfico do casco afetado revela alterações similares às vistas em casos de laminite clássica, incluindo rotação da terceira falange e osteíte podal (JOHNSON, 2004).

Dessa maneira, circunstâncias associadas tanto com excesso de GC e/ou resistência à insulina poderiam aumentar o risco para o desenvolvimento da laminite em cavalos adultos. Entretanto, existe muita controvérsia se esses fatores poderiam mesmo levar ao desencadeamento da laminite. Se forem causadores dessa afecção, a patogênese da doença nesses casos seria, provavelmente diferente daquela associada com doenças do trato gastrointestinal e endotoxemia. O entanto, doenças severas associadas com endotoxemia também são caracterizadas por hipercortisolismo, ativação neuroendócrina e resistência à insulina. É interessante notar que, juntamente ao fato que GC causa resistência à insulina, a condição de resistência à insulina também aumenta a sensibilidade tecidual à ação dos GC. Sugere-se que alterações estruturais no casco equino semelhantes às da laminite podem ocorrer devido a ação de GC ou resistência à insulina. Apesar dessas alterações não serem dolorosas e não estarem associadas com inflamação, elas poderiam predispor os cavalos afetados ao desenvolvimento de laminite por outras razões (JOHNSON, 2004).

1.2.3.c. Sinais Clínicos e Estágios da Laminite

Alguns sinais clínicos característicos da laminite são: temperatura elevada da superfície dorsal da muralha do casco, aumento da pulsação da artéria digital, sensibilidade aumentada aos testes de pinçamento do casco, edema do borda coronária e deslocamento do peso para os membros pélvicos (nos casos de laminite nos membros torácicos). Os sinais mais severos são: descolamento da sola ou palpação de depressão localizada na borda coronária, ambos indicando rotação ou afundamento da falange distal dentro da muralha do casco (RIEGEL & HAKOLA, 1997; HOOD, 1999c).

Com o intuito de melhorar a definição da severidade dos sinais clínicos exibidos pelos eqüinos acometidos pela laminite, um sistema de escores foi estabelecido por OBEL em 1948 (Tab.1).

Tabela 1 – Classificação da claudicação conforme OBEL (1948)

| ESCORE | Sintomas |
|--------|---|
| Grau 1 | o eqüino levanta os membros torácicos incessantemente, alternando o apoio no solo em intervalos de poucos segundos. A claudicação é pouco pronunciada e o animal retira rapidamente o membro do solo. |
| Grau 2 | o eqüino movimenta-se voluntariamente ao passo, encurtando ainda mais a fase de apoio ao solo. Ainda é possível erguer-se um dos membros torácicos do animal sem muita dificuldade. |
| Grau 3 | o eqüino reluta em locomover-se e reage, não permitindo qualquer tentativa de erguer um de seus membros torácicos. |
| Grau 4 | o eqüino somente inicia a locomoção se for forçado, e ao fazê-lo, projeta simultaneamente os dois membros torácicos para cima e para frente. Acima desse grau, dificilmente o animal conseguirá manter-se em posição quadrupedal passando a maior parte do tempo em decúbito. |

A laminite pode ser classificada quanto a sua progressão em quatro estágios: prodrômico, agudo, subagudo e crônico (Fig. 6). O estágio prodrômico engloba o período entre o insulto inicial e o aparecimento dos primeiros sinais de claudicação aguda associados com a laminite (HOOD et al., 1993). A duração real desta fase depende do fator desencadeador que leva ao desenvolvimento da doença. A experiência clínica com a sobrecarga de CHO como o fator desencadeador da doença indica que esse estágio pode durar em média 40 horas, podendo variar entre 20 e 60 horas. Durante este período os mecanismos que levam ao início da claudicação tornam-se operativos sendo, por isso, de fundamental importância. Dessa maneira, muitos estudos envolvendo os mecanismos da fisiopatologia e as terapêuticas para a prevenção desta doença serão mais eficientes se focados neste estágio. Infelizmente, o estágio prodrômico é relativamente assintomático e por isso, em muitos pacientes, os sinais só serão notados quando estes já estiverem no estágio agudo da doença.

O estágio agudo inicia-se no momento em que se observam os primeiros sinais de claudicação extendendo-se, em média, até 72 horas após o aparecimento desses sinais ou até que se evidencie o colapso mecânico da falange distal dentro da cápsula

do casco, com afundamento ou rotação da falange distal (HOOD, 1993). Nesse estágio os objetivos terapêuticos visam limitar a severidade da afecção de forma que o paciente tenha maiores chances de entrar para a fase subaguda, onde o equino exibe sinais clínicos por mais de 72 horas sem falência estrutural do casco. Este estágio pode durar entre oito e 12 semanas e os procedimentos terapêuticos visam proteger o casco para impedir a instalação da laminite crônica. Se em algum momento o equino desenvolver falência estrutural do casco, rotação ou afundamento da falange distal ficará caracterizado a fase crônica. As fases aguda e crônica estão altamente associadas com o prognóstico, uma vez que os equinos com laminite crônica serão, provavelmente, afetados pela doença pelo resto de suas vidas (HOOD, 1999a).

Na forma crônica da laminite, instala-se a necrose isquêmica com o afundamento e a rotação da falange distal, alterando sua relação de paralelismo com a muralha do casco. Os fenômenos mórbidos determinam o comprometimento dos vasos da coroa do casco, levando às deformidades que se caracterizam por convexidade da sola, crescimento dos talões, concavidade da face cranial da muralha e formação de anéis transversais devido às deformações no sistema de túbulos do casco e alterações no metabolismo da ceratogênese (HOOD, 1999b). A cronificação da laminite promove redução da resposta dolorosa em virtude do abrandamento dos processos congestivos e exsudativos, responsáveis em parte, pelo deslocamento da falange distal. Concomitantemente, ocorre redução dos sinais excitatórios. Se a rotação da falange persistir, ela pode comprimir o cório da sola, perfurá-lo e exteriorizar-se, podendo transformar o processo asséptico em séptico.

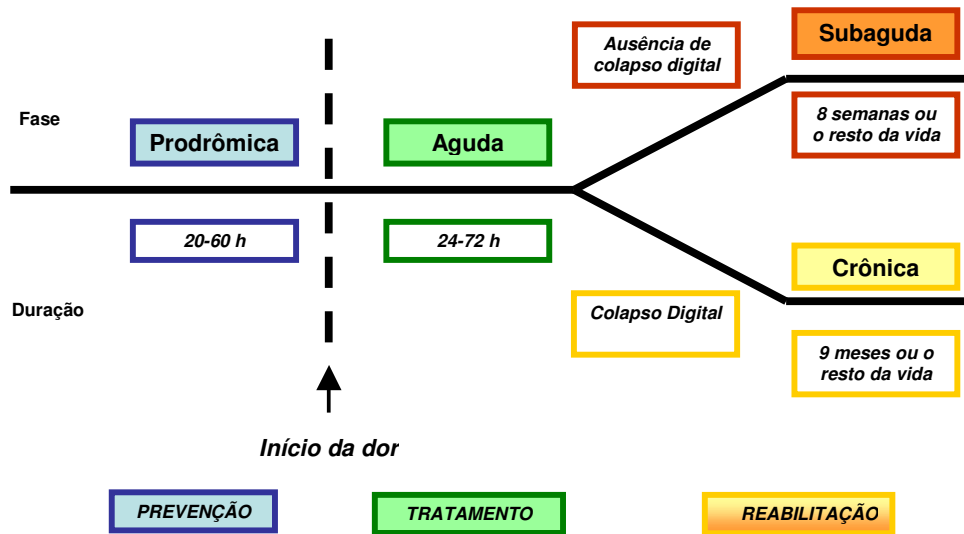


Figura 6 – Esquema ilustrativo da duração e objetivos terapêuticos nos quatro estágios da laminite: prodrômico, agudo, subagudo e crônico (adaptado de HOOD, 1999a).

MOORE & ALLEN (1995), na tentativa de estimar os estágios de deterioração progressiva do casco equino durante a laminite, publicaram ilustrações procurando associar as mudanças internas no casco com os sinais clínicos exibidos pelo equino. Essas divisões foram feitas baseadas nos graus de claudicação descritos por OBEL (1948). Devido à complexidade do problema clínico da laminite, esses autores apresentaram, didaticamente, os estágios de forma isolada e distinta. No entanto sabe-se que esses estágios podem se sobrepor. Apesar de ter sido empregado o termo estágio, isso não significa que a enfermidade progrida através de cada um para finalmente atingir o último estágio.

a) Anatomia normal

Sob condições clínicas normais, a perfusão da região laminar e o alinhamento da coluna óssea são normais e o equino apóia 60% de seu peso corporal nos membros torácicos (Fig. 7).

b) Laminite em estágio inicial (prodrômico)

Nesse estágio o animal ainda não apresenta sinais clínicos, no entanto o fluxo sangüíneo microvascular já pode estar alterado. Em alguns casos, acredita-se que o equilíbrio dinâmico nos tecidos moles ao redor da falange distal possa ser interrompido sem que haja evidências clínicas da doença. A radiografia lateral do casco não apresenta alterações aparentes. (Fig. 8).

c) Laminite leve (grau 1 de OBEL; aguda)

Esse estágio é caracterizado pela troca incessante do apoio de um membro para o outro. Esse comportamento presumivelmente reflete o início do processo álgico nos membros e o animal tenta achar uma posição confortável para minimizar o desconforto causado pelo apoio do peso corpóreo (Fig. 9).

d) Laminite moderada (graus 2 e 3 de OBEL)

O eqüino passa a se apoiar nos membros pélvicos na tentativa de diminuir a pressão sobre os membros doloridos. O ângulo da coluna óssea formada pelas falanges proximal, média e distal e o sesamóide distal também sofre alteração e o animal apresenta padrão de claudicação típico de um animal com laminite aguda. Eles se movem como se estivessem “pisando em ovos”. Nessa fase as alterações no passo são mais evidentes quando o eqüino é levado a andar em círculo. O animal hesita quando é estimulado a mover-se. A situação no interior do casco também já se alterou bastante e os tecidos estão começando a se tornar edematosos e isquêmicos. Acúmulo de sangue pode ocorrer no tecido mole indicando uma separação precoce da lâmina dérmica e epidérmica (Fig. 10).

e) Rotação distal da falange distal

Os animais nesse estágio da doença resistem veementemente a qualquer tentativa de levantamento de um dos membros torácicos, o que os força a apoiar o peso em um único membro. Alguns animais se negam a mover-se a não ser que sejam forçados. O padrão de claudicação é o clássico “pisando em ovos” da laminite severa. Em muitos desses animais, a separação das lâminas dérmicas e epidérmicas é

bastante pronunciada e o ápice da falange distal mostra-se rotacionado em direção à sola. Essa alteração é bastante evidente na radiografia lateral do casco. Também pode haver evidência de acúmulo de gás ou líquido na interface da lâmina (Fig. 11). Embora a rotação da falange distal seja mais comum nos casos crônicos, ela pode ocorrer a partir do segundo dia, em casos mais graves de laminite aguda (THOMASSIAN, 1997).

f) Laminite severa (grau 4 de OBEL)

A progressão na laminite aguda para a forma severa torna-se característica pela aproximação da falange distal com a sola, e por vezes, pela perfuração desta última. Em muitos casos, o equino passa a maior parte do tempo deitado e reluta em ficar na posição quadrupedal ou andar. Se obrigado a ficar na posição quadrupedal, o animal apóia o máximo do peso corporal nos membros pélvicos. O grau 4 de OBEL representa o estágio final na perda progressiva da aderência do tecido mole entre a falange distal e a muralha do casco. A rotação do aspecto dorsal da falange distal pode exceder 12° quando comparada com o aspecto dorsal da muralha do casco (Fig. 12).

g) Afundamento distal da falange distal

Em contraste com o achado mais comum da rotação da falange distal, em casos raros, a falange distal pode se deslocar distalmente no casco, em direção a sola. A razão para que isso ocorra em alguns eqüinos e em outros só haja a rotação da falange é desconhecida, mas não existe dúvida de que essa é uma forma extremamente severa de laminite. Presumivelmente, a separação das lâminas dérmicas e epidérmicas ocorre circunferencialmente ao redor da falange distal, e o peso do animal, transmitido através da coluna óssea, força a falange distal distalmente. O achado clínico mais comum é uma depressão palpável no bordo coronário por onde poderá ser drenado sangue ou transudato (Fig. 13).

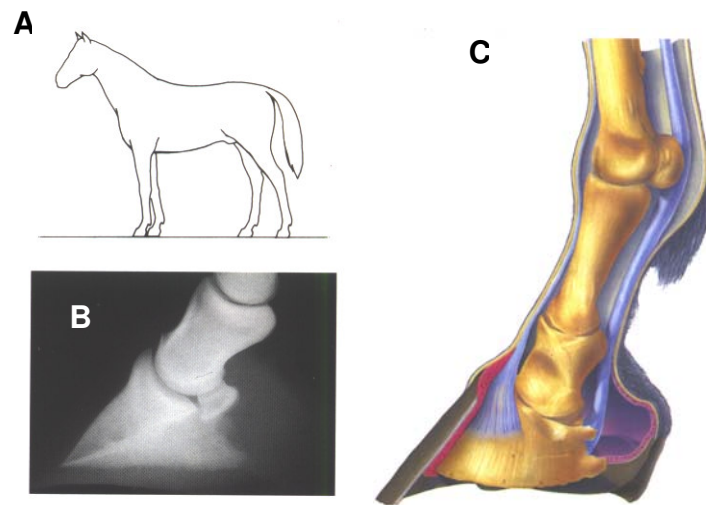


Figura 8 – Representação esquemática: A. Apresentação postural do eqüino; B. Imagem radiográfica lateral do casco ainda sem alterações; C. Alinhamento ósseo da porção distal do apêndice locomotor (adaptado de MOORE & ALLEN, 1995).

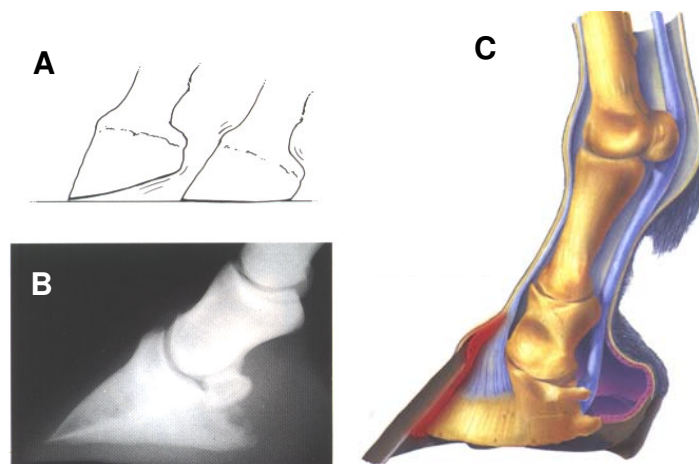


Figura 9 – Representação esquemática: A. troca de apoio dos membros; B. Imagem radiográfica lateral do casco ainda sem alterações; C. Alinhamento ósseo da porção distal do apêndice locomotor (adaptado de MOORE & ALLEN, 1995).

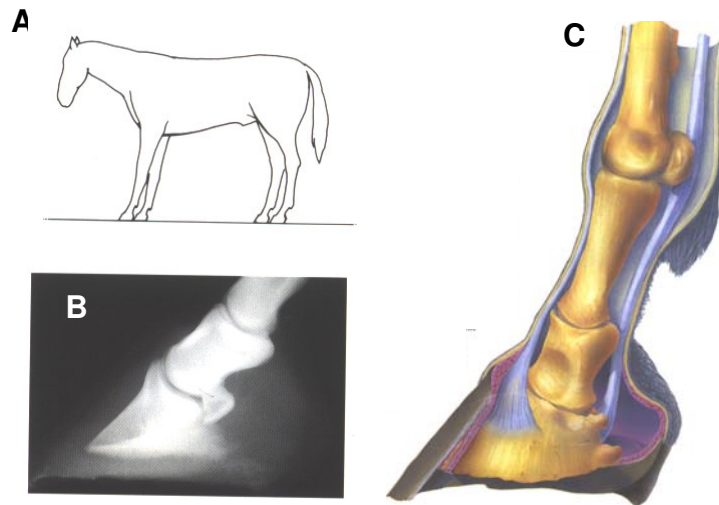


Figura 10 – Representação esquemática: A. Apresentação postural do equino com apoio forçado; B. Imagem radiográfica lateral do casco evidenciando o aumento da densidade dentro das estruturas entre a superfície dorsal da falange distal e a muralha do casco, indicativo de acúmulo de líquido; C. Alinhamento ósseo da porção distal do apêndice locomotor (adaptado de MOORE & ALLEN, 1995).

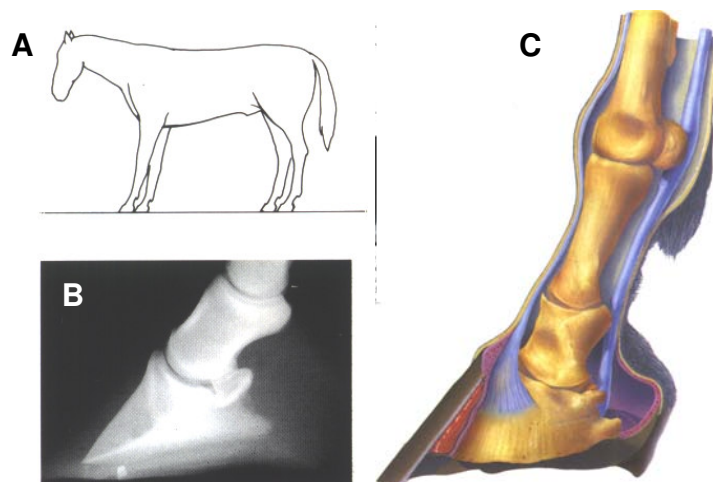


Figura 11 – Representação esquemática: A. Apresentação postural do equino com deslocamento de apoio para os membros pélvicos; B. Imagem radiográfica lateral do casco evidenciando a perda do paralelismo entre a superfície dorsal da falange distal e a muralha do casco, o que indica a rotação distal

da falange dentro da cápsula do casco; C. Alinhamento ósseo da porção distal do apêndice locomotor (adaptado de MOORE & ALLEN, 1995).

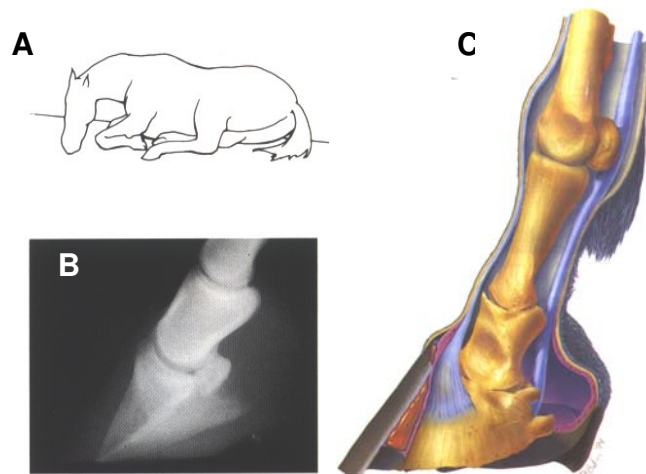


Figura 12 – Representação esquemática: A. Apresentação postural do equino em decúbito; B. Imagem radiográfica lateral do casco evidenciando o aspecto mais distal da falange distal rotacionado penetrando na sola; C. Alinhamento ósseo da porção distal do apêndice locomotor (adaptado de MOORE & ALLEN, 1995).

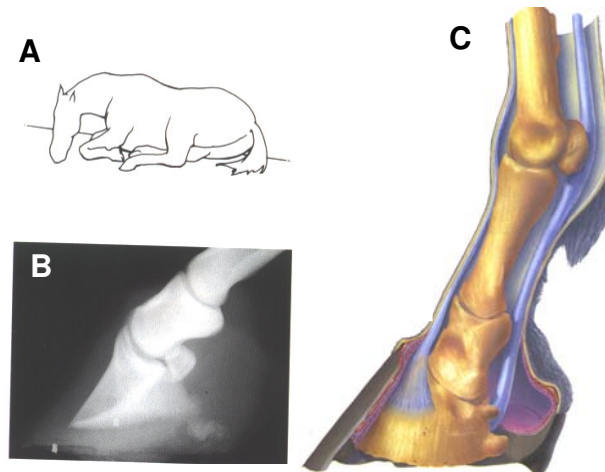


Figura 13 – Representação esquemática: A. Apresentação postural do equino em decúbito; B. Imagem radiográfica lateral do casco mostrando aumento da densidade dos tecidos moles entre a falange distal e a muralha do casco, sugerindo acúmulo de líquido nesta região e fenda evidente no bordo

coronário, indicando o deslocamento distal da falange distal dentro da cápsula do casco; C. Alinhamento ósseo da porção distal do apêndice locomotor (adaptado de MOORE & ALLEN, 1995).

1.2.3.d. Aspectos Anatomopatológicos da Laminite

Muitos autores descreveram, por meio da histopatologia, os vários estágios de desenvolvimento da laminite (OBEL, 1948; GARNER et al., 1975; KAMEYA et al., 1980; ROBERTS et al., 1980). OBEL (1948) e EKFAŁCK et al. (1992) concluíram que a epiderme laminar era o local das lesões primárias da laminite. ROBERTS et al. (1980) consideraram que a severidade da afeção epidérmica laminar estava diretamente correlacionada com os sinais clínicos da doença. Amostras retiradas do aspecto dorsal da muralha do casco de eqüinos com laminite induzida por sobrecarga de CHO permitiram a descrição sequencial da deformação e alongamento da epiderme laminar durante o agravamento da claudicação.

POLLITT (1996), utilizando cortes histológicos de tecido laminar corados com corantes específicos para tecido conectivo (hematoxilina e eosina; H&E) e membrana basal (ácido periódico Schiff; PAS) padronizou um sistema de classificação das lesões da epiderme laminar atribuídas à laminite de acordo com a progressão de sua severidade, a saber:

a) Grau N (normal)

A maioria dos núcleos das células basais é ovalada e situada no pólo apical da célula. O pólo apical está mais distante da membrana basal (MB). O eixo longo do núcleo da célula basal está orientado em ângulo reto ao eixo queratinizado das lâminas epidérmicas secundárias (LES) (coloração H&E).

A MB nas células normais penetra profundamente na cripta entre os pares de LES e contorna claramente as extremidades cônicas de cada lâmina dérmica secundária (LDS). A proximidade da extremidade das LDS é equivalente à distância de uma ou duas células epidermais basais. As extremidades das LES são sempre arredondadas e nunca cônicas ou pontudas (coloração PAS).

b) Grau 1 (leve)

Quando observadas em aumento menor, os eixos queratinizados das LEP e LES parecem normais. No entanto as LES apresentam-se mais estreitas, alongadas e suas extremidades são menos arredondadas que o normal. O núcleo das células basais apresenta-se arredondado e localizado mais centralmente no citoplasma, próximo da MB. Quando localizados corretamente os núcleos estão orientados anormalmente com seus eixos longos paralelamente ao eixo queratinizado das LES (coloração H&E).

A simetria precisa da MB, contornando as colunas alternadas de LES e LDS não está mais aparente. A MB da base da maioria das LES está ausente e essas aderiram umas às outras (coloração PAS).

c) Grau 2 (moderado)

As LEP parecem relativamente normais quando observadas em aumento menor. Entretanto, suas extremidades estão alongadas e com aparência ondulada. A ausência de tecido conectivo entre as LEP é difusa e o arredondamento do núcleo das células basais é evidente. Os neutrófilos estão presentes, particularmente, ao redor dos vasos adjacentes às extremidades das LEP (coloração H&E).

Em aumento maior, muitos núcleos das células basais apresentam-se pequenos e intensamente corados, particularmente aqueles adjacentes às extremidades das LDS, nas quais o tecido conectivo está ausente. Muitos núcleos das células basais apresentam-se arredondados e encontram-se situados próximos a MB. O citoplasma basal está palidamente corado e vacuolizado. Muitas das LES apresentam as extremidades afiladas saindo da LDP em direção à falange distal. A vacuolização celular e o núcleo pequeno e arredondado são mais pronunciados próximo às extremidades das LES. O arranjo simétrico da anatomia laminar desapareceu e, apesar de as células basais das extremidades das LEP terem aspecto quase normal, muitas possuem o núcleo ovalado situado próximo ao ápice da célula com figuras mitóticas sugerindo uma resposta proliferativa (coloração H&E).

A MB encontra-se entre as bases das LES e, conseqüentemente, as extremidades das LDS estão próximas ao eixo queratinizado das LEP. A distância entre a MB e o bordo do eixo das LEP aumenta. Esta mudança na relação da MB com o eixo

queratinizado da LEP é a maior diferença entre o Grau 1 e Grau 2 da laminite. A MB está relativamente intacta na região medial da LES e próximo das extremidades, apesar de apresentar o contorno ondulado e intermitentemente borrado. Entretanto, a MB com características regulares está presente na extremidade da maioria das LES (coloração PAS).

d) Grau 3 (severo)

O centro dos eixos das LEP está intacto, mas apesar das extremidades das LEP terem em geral formato arredondado, estão afiladas e retraídas. Os núcleos axiais das LES são dificilmente notados como entidades distintas arquiteturalmente, sendo que a maioria das células epidermais formou uma massa amorfa entre a lâmina epidérmica e a dérmica. As poucas LES observadas perderam os anexos de tecido conectivo (coloração H&E).

Em maior aumento, as extremidades achatadas das LEP consistem de tubos ondulados vazios, contendo material róseo e, ocasionalmente, núcleos de células epidermais basais, alguns deles picnóticos. Os citoplasmas das células basais das LES estão levemente corados e vacuolizados. As LES apresentam alongamento e estreitamento extremo. Muitos dos núcleos têm formato fusiforme e alongados na direção da lâmina. Não existe tecido conectivo detectável entre as LES e a maioria da epiderme aparece como uma massa de núcleo amorfa alongada e os citoplasmas das células basais intercalam-se entre as sobras dos eixos queratinizado das LES. Apesar de haver muitos núcleos picnóticos nas estruturas epidermais, muitos parecem intactos. Os vasos sangüíneos adjacentes às extremidades das LEP estão rodeados de leucócitos, no entanto a resposta inflamatória é mínima. Os vasos sangüíneos da derme sublamina parecem normais (coloração H&E).

As extremidades das LEP restantes estão destituídas de células epidermais e consistem, quase totalmente, de MB positiva para a coloração PAS. Muitas extremidades das LEP estão colabadas com acúmulo de corante denso nos pontos onde as duas camadas da MB se encontram. Neutrófilos positivos para a coloração PAS são observados ao redor das extremidades das LEP e alguns entre as camadas de MB e, conseqüentemente, dentro do compartimento epidermal. As extremidades

achatadas das poucas LES na região medial das LEP ainda possuem cobertura da MB (coloração PAS).

1.2.3.e. Modelos Experimentais de Indução da Laminite Aguda

1.2.3.e.a. Modelo da Sobrecarga de CHO

Um método consistente e de relevância clínica para a indução da laminite aguda em eqüinos fazia-se necessário para avaliar por completo o mecanismo da fisiopatologia e desenvolver potenciais meios de prevenção e tratamento dessa doença.

Desde meados dos anos 50 até início dos anos 70 do século passado, poucos trabalhos significativos sobre laminite em eqüinos foram publicados até que, em 1975, GARNER et al., começaram a questionar, uma vez mais, os mecanismos e a fisiopatologia dessa doença com estudos utilizando o modelo experimental da sobrecarga de CHO anteriormente descrito por Obel (1948). Este se tornou o modelo padrão utilizado para estudar a laminite associada com sobrecarga de CHO pelas próximas três décadas. O método consiste na administração, por via nasogástrica, de uma ração com elevado teor de CHO composta por 85% de amido de milho e 15% de farinha de celulose de madeira, na dose de 17,6 g/kg de PV.

O desenvolvimento deste modelo permitiu a esses pesquisadores estudar as mudanças na microflora cecal, alterações na hemodinâmica sistêmica, alterações hematológicas, alterações na bioquímica sanguínea e a liberação de endotoxina de bactéria Gram-negativas com a translocação subsequente para a circulação sistêmica. A cascata exata dos eventos ligando a administração do CHO ao desenvolvimento da laminite aguda ainda não está totalmente esclarecida. Alterações na flora cecal, acidose láctica e endotoxemia têm sido associadas a esse modelo, mas o estímulo direto das alterações sistêmicas e digitais que ocorrem não foi ainda totalmente estabelecido (GARNER et al., 1975b; MOORE et al., 1979; KRUEGER et al., 1986; SPROUSE et al., 1987; WEISS et al., 1998a; WEISS et al., 2000).

Nos estudos utilizando esse modelo, os eqüinos desenvolvem sinais de laminite que progridem para o grau 3 de OBEL dentro de aproximadamente 40 horas após a administração do CHO. Os animais apresentam alterações semelhantes às aquelas desenvolvidas por eqüinos com laminite clínica tais como, aumento da frequência

cardíaca e da temperatura retal, aumento do hematócrito, leucocitose e hiperproteinemia (COFFMAN et al., 1972; GARNER et al., 1975a; HARKEMA et al., 1978; MOORE et al., 1981; FAGLIARI et al., 1998).

As alterações que precedem o aparecimento dos sinais clínicos utilizando o CHO são: hipotensão arterial e venosa seguida de hipertensão arterial, aumento do hematócrito, leucocitose e hiperproteinemia. Os membros dos eqüinos apresentam-se frios dentro de 24 horas após a administração de CHO até a demonstração dos sinais clínicos da laminite, no entanto a temperatura encontra-se elevada na região do bordo coronário. As alterações na hemodinâmica sistêmica incluem queda na pressão atrial direita, diastólica sistêmica arterial e sistólica sistêmica arterial, alcançando o valor máximo por volta de 16 horas após o CHO ser administrado. Essa queda de pressão é seguida por um aumento constante da pressão atrial direita, pressão diastólica arterial e pressão sistólica arterial (GARNER et al., 1975b). Esses resultados sugerem que mudanças cardiovasculares sistêmicas e vasculares digitais locais bem como, liberação ou ativação aumentada de mediadores vasoativos ocorrem em eqüinos com laminite.

A hemodinâmica específica das forças que agem sobre a microcirculação laminar, em eqüinos com laminite experimental, vem sendo amplamente estudada e definida utilizando-se cascos de eqüinos perfundidos isoladamente (ROBINSON et al., 1976; ALLEN et al., 1990; EATON et al., 1995). GARNER et al. (1975a) introduziram a hipótese de que a causa predominante da laminite após a sobrecarga de CHO fosse um distúrbio no fluxo sangüíneo digital, que ocorre durante o início da síndrome após a sobrecarga de CHO no trato gastrointestinal. Medições das forças de Starling demonstraram aumento da resistência venosa com o desenvolvimento da laminite (ALLEN et al., 1990; EATON et al., 1995; KATWA, et al., 1999; STOKES et al., 2002a; STOKES et al., 2002b).

De particular importância é o achado de que a relação entre a resistência pré e pós-capilar está diminuída nos estágios prodrômicos da laminite. Esses achados dão base à hipótese de que o tônus venoso inicie a laminite. A venoconstrição resulta em aumento da resistência vascular e da pressão hidrostática capilar. Este desbalanço aumenta a força hidrostática no capilar promovendo o fluxo de sangue através do leito capilar dentro do casco, resultando em edema da lâmina enquanto a permeabilidade

capilar permanece normal (Fig 6) (ROBINSON et al., 1976; ALLEN et al., 1990, EATON et al., 1995). A pressão intersticial laminar aumentada, devido à formação do edema, excede a pressão crítica de fechamento dos capilares digitais do eqüino, uma vez que eles estão localizados entre a cápsula do casco e a superfície do osso da falange distal, ambas de consistência rígida levando, portanto, a uma “síndrome compartimental” (ALLEN et al, 1990).

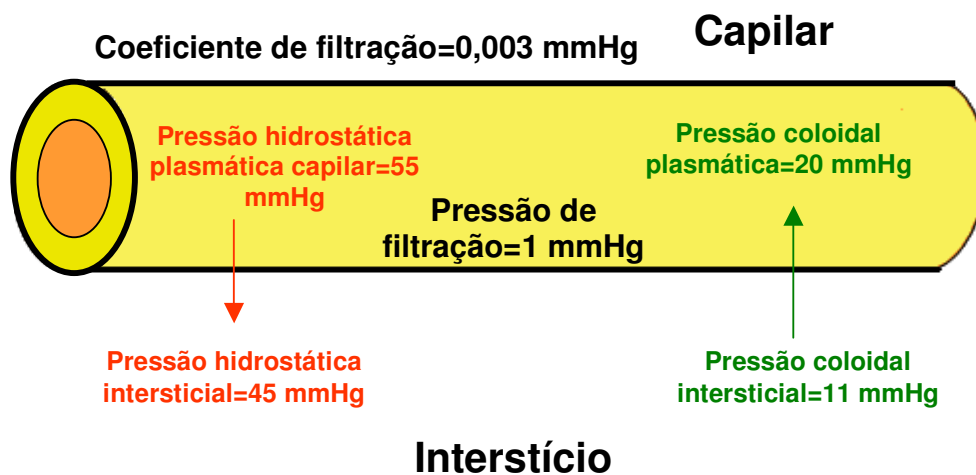


Figura 5 - Diagrama representando as medidas das forças de Starling da circulação digital de eqüinos após laminite experimental por sobrecarga de CHO usando bomba de perfusão em preparação digital extra-corpórea. Note que o valor da pressão de filtração é 1 mmHg nesses tecidos devido ao desequilíbrio das pressões capilar e intersticial com as pressões plasmática e coloidal intersticial. O resultado é um efluxo de líquido do capilar e conseqüente formação de edema intersticial (ALLEN et al., 1990).

Quando a pressão tecidual aumenta acima da pressão crítica de fechamento dos capilares, esses colapsam levando a isquemia tecidual. Muitos pesquisadores têm afirmado que o fluxo sanguíneo é reduzido pela formação de anastomoses arteriovenosas ao nível do borda coronária (MOORE et al., 1989; ALLEN et al., 1990, HUNT, 1991). Pesquisas têm demonstrado, indiretamente, redução na perfusão do casco por meio de radiografia contrastada e temperatura da muralha do casco (ACKERMAN et al., 1975; ADAIR et al., 2000; HOOD et al., 2001). Pela radiografia

contrastada demonstrou-se redução na perfusão da vasculatura do casco após a laminite induzida por sobrecarga de CHO (ACKERMAN et al., 1975).

Durante o estágio prodrômico da laminite, utilizando-se o modelo de CHO, HOOD et al. (2001) avaliaram a temperatura da muralha do casco como indicador da perfusão laminar e observaram diminuição entre oito e 12 horas antes do início da claudicação, indicando diminuição da perfusão laminar ou diminuição da atividade metabólica. Adicionalmente, a temperatura da superfície do casco elevou-se de maneira significativa comparada com os valores basais, assim que os sinais clínicos tornaram-se evidentes. POLLITT & DAVIES. (1998) demonstraram elevação da temperatura do casco entre 16 e 40 horas após a sobrecarga de CHO.

Embora seja provável que numerosos mediadores contribuam para as alterações vasculares mencionadas anteriormente, um mediador principal já foi identificado. KATWA et al. (1999) demonstraram elevação na expressão de ET-1 nos tecidos conectivos laminares obtidos de eqüinos com laminite induzida por sobrecarga de CHO e eqüinos com laminite crônica quando comparado com o grupo controle. Após a laminite experimental, a formação de trombos microvasculares é detectada na lâmina, adicionalmente às alterações hemodinâmicas previamente mencionadas, uma contribuição provável para a diminuição na perfusão laminar devido à obstrução microvascular (WEISS et al., 1995, WEISS et al., 1997).

Em estudo examinando as alterações hematológicas associadas com a laminite induzida por sobrecarga de CHO, observou-se diminuição significativa das plaquetas sanguíneas oito horas após o início da claudicação severa (MOORE et al., 1981). Por outro lado, PRASSE et al. (1990) não encontraram diferenças significativas na coagulação e fibrinólise em eqüinos após a administração do CHO, sugerindo que um desbalanço nesses mecanismos não é um fator significativo na fisiopatologia da laminite.

Estudos histológicos avaliando as mudanças nas lâminas do casco durante o desenvolvimento da laminite num período entre 48 e 96 horas após a indução com o modelo do CHO demonstraram que logo após o início da claudicação ocorreram as primeiras alterações na vasculatura digital, incluindo inchaço das células endoteliais e formação de edema moderado (MARKS, 1984; MOSTAFA, 1986; HOOD et al, 1993).

Os capilares laminares tornaram-se congestionados com presença de eritrócitos ocorrendo dentro de oito horas. Entre seis e 12 horas, observou-se infiltração leucocitária que desapareceu conforme as células inflamatórias migraram para a camada epidérmica. As células endoteliais arteriolares tornaram-se deformadas como resultado do processo citoplasmático que se estabeleceu no lúmen. Trombos microvasculares acompanhados da formação de edemas severos foram observados dentro de 24 horas, e hemorragia na lâmina dérmica primária cerca de 70 horas após a administração do CHO. A avaliação histológica da lâmina oito horas após o desenvolvimento da claudicação demonstrou encurtamento e estreitamento das estruturas laminares acompanhados de redução, achatamento e deslocamento das células epiteliais (MARKS, 1984; MOSTAFA, 1986). As lâminas dérmicas e epidérmicas secundárias tornaram-se redirecionadas de maneira tal que as lâminas mais próximas à base da lâmina dérmica primária estavam posicionadas em direção ao osso e aquelas mais próximas do ápice laminar estavam direcionadas para a muralha do casco.

Alterações morfológicas secundárias aos danos das células epiteliais incluíram inchaço, vacuolarização, edema do núcleo e/ou picnose e infiltração leucocitária da lâmina epidérmica secundária o que pode ser observado tão cedo quanto 24 horas após o início da claudicação (MOSTAFA, 1986). Adicionalmente, POLLITT (1996) observou que, em amostras de tecido laminar de eqüinos coletadas após 48 horas da administração de CHO, a membrana basal laminar apresentou-se desintegrada e a fixação da membrana basal com as células basais da lâmina epidérmica havia rompido.

As alterações nas funções das células endoteliais devido à laminite aguda podem afetar as ações endotélio-dependentes e a responsividade da circulação digital a agentes vasoativos. Resultados de estudos *in vitro* indicam que as veias digitais de eqüinos sadios possuem capacidade substancial para o relaxamento endotélio-dependente pela ação do NO, contando com aproximadamente 70% a 85% de relaxamento máximo induzido pela acetilcolina (BAXTER et al, 1989b; VENUGOPAL et al., 1997). Em eqüinos com laminite induzida por sobrecarga de CHO, o relaxamento das veias digitais mediado pela acetilcolina, *in vitro*, apresentou-se reduzido sugerindo capacidade reduzida de produção de NO pelo endotélio vascular digital tornando, desta

maneira, os vasos mais sensíveis ou vulneráveis a ação de agentes vasoconstritores (SCHNEIDER et al., 1999).

1.2.3.e.b. Modelo do Extrato de Nogueira Preta (*Juglans nigra*)

O modelo do extrato de noqueira preta (NP) para indução da laminite foi descrito pela primeira vez por TRUE et al. (1979). MINNICK et al. em 1987 considerou este modelo mais eficiente para causar laminite do que o modelo da sobrecarga de CHO descrita por Obel (1948).

Sabendo que os eqüinos desenvolviam laminite aguda após exposição à serragem fresca da NP, os pesquisadores se interessaram em investigar se o extrato obtido desta planta, administrado por via nasogástrica, poderia induzir laminite aguda de maneira consistente.

O método exige a seleção de um tronco a ser cortado de uma árvore viva durante o outono com aproximadamente 25 cm de diâmetro. Após a remoção da casca, obtêm-se a serragem a partir do cerne da madeira. Deve-se então embeber a serragem (2 g/kg PV) em água e em seguida coar essa mistura, o que resultará em um extrato preto que é então administrado via tubo nasogástrico. No entanto, a análise do extrato ainda não revelou o fator laminogênico (MINNICK et al., 1987).

GALEY et al. (1991), utilizando este modelo, observaram que todos os 10 eqüinos avaliados desenvolveram edema e, em alguns casos, depressão da borda coronária, enquanto oito animais demonstraram sinais clínicos de laminite 12 horas após a administração do extrato. Nas análises hematológicas observou-se diminuição na contagem total de leucócitos quatro horas após a indução, representando, no mínimo, 30% de diminuição comparada com os valores basais. A partir de oito horas da indução houve aumento na contagem de leucócitos e do hematócrito e hiperglicemia. As alterações na contagem dos leucócitos foram muito semelhantes aos resultados encontrados após a administração do CHO (GARNER et al., 1975a). GALEY et al. (1991) sugeriram que as alterações leucocitárias eram características de eqüinos com endotoxemia, no entanto análise das amostras de sangue, três horas após a indução com NP, não detectaram endotoxina em nenhum dos animais tratados. A diminuição na pressão venosa central e diminuição inicial da pressão arterial sistêmica não foram

pronunciadas com o uso da NP quando comparado com o modelo de indução por sobrecarga de CHO (EATON et al., 1995).

O modelo do extrato de NP foi um grande avanço no estudo da laminite, uma vez que a diarreia e os sinais de endotoxemia não foram evidentes e o tempo para o desenvolvimento dos sinais associados com laminite foi mais curto quando comparado com o modelo do CHO (MINNICK et al., 1987; GALEY et al., 1991; EATON et al., 1995; ADAIR et al., 2000; FONTAINE et al., 2001).

EATON et al. (1995) avaliaram as forças de Starling após a administração do extrato de NP utilizando preparação extra-corpórea do casco perfundido através de bomba. As medidas das forças de Starling foram obtidas entre duas e quatro horas após a administração do extrato de NP uma vez que havia diminuição de 30% na contagem total de leucócitos. O resultado predominante foi o aumento na resistência venosa pós-capilar e na pressão hidrostática capilar, achados semelhantes àqueles após a sobrecarga de CHO. Não houve alteração na resistência pré-capilar, comparado com eqüinos sadios, ao contrário do que ocorre no modelo do CHO (ALLEN et al., 1990; EATON et al., 1995).

As diferenças entre os dois modelos podem ser devido à diferença no intervalo de tempo no desenvolvimento da laminite para a ocorrência dos eventos. A severidade da venoconstricção que acompanhou a laminite induzida com o extrato de NP foi menos pronunciada do que na sobrecarga de CHO. Essas alterações, de menor severidade com o uso do modelo do extrato de NP, podem ser devido à diferença na fisiopatologia da doença, ou, mais provavelmente, devido às alterações nas forças de Starling que acompanham a laminite, uma vez que o extrato de NP foi avaliado em estágios diferentes da doença do que aqueles avaliados com o modelo do CHO (duas a quatro horas contra 16 horas do CHO).

ADAIR et al. (2000), utilizando o laser Doppler para medir a perfusão capilar laminar, observaram que o fluxo sanguíneo microvascular laminar diminuiu nas primeiras horas após a administração do extrato de NP. Essa diminuição inicial foi seguida por retorno do fluxo sanguíneo microvascular próximo aos valores basais, voltando a apresentar diminuição aproximadamente oito horas após o desenvolvimento da laminite, correspondendo temporalmente ao desenvolvimento dos sinais clínicos

(ACKERMAN et al., 1975). Embora o método de avaliação da perfusão laminar utilizado nestes estudos tenha sido diferente, os achados são semelhantes àqueles descritos por HOOD et al. (2001) que utilizaram a temperatura da superfície do casco como indicador da perfusão laminar após a administração de CHO.

Outro estudo utilizando a cintigrafia gama de albumina com isótopos de albumina (^{99m}Tc) infundidos antes e 12 horas após a administração do extrato de NP, demonstrou diminuição da perfusão nos membros torácicos. Com o início da laminite, a perfusão estava diminuída na derme dorsal e coronária laminar comparada com o restante do membro pélvico (GALEY et al., 1990b) Esses estudos corroboram com aqueles que avaliaram as alterações da perfusão após a laminite induzida por sobrecarga de CHO e, juntos, apresentam forte evidência de um evento isquêmico acontecendo dentro do casco durante as fases iniciais do desenvolvimento da laminite.

O papel da resposta inflamatória no desenvolvimento da laminite é um assunto bastante questionado e controverso. Um estudo recente conduzido por FONTAINE et al. (2001) avaliou a expressão de IL-1 β nas lâminas de eqüinos após a diminuição de 30% na contagem de células brancas, típica em eqüinos com laminite induzida por extrato de NP (aproximadamente três horas após a indução). Eles observaram aumento na expressão de IL-1 β oferecendo evidências da ocorrência de resposta inflamatória precoce nos estágios prodrômicos da doença. Os autores afirmaram que a expressão aumentada de citocinas inflamatórias tais como IL-1 β , altera vários sistemas incluindo a liberação de substâncias vasoativas, pró-coagulantes e outros mediadores inflamatórios resultando em alterações hemodinâmicas e hematológicas de ocorrência conhecida com o desenvolvimento da doença.

Análise de cortes histológicos de tecido laminar do casco de eqüinos após 12 horas da administração do extrato de NP, evidenciou vacuolização moderada das lâminas dérmicas secundárias. A vasculatura desses cortes apresentou-se moderadamente congesta. Os ápices das LDP apresentaram ausência de definição celular e algumas áreas de necrose. Amostras de eqüinos eutanasiados 84 horas após a administração do extrato de NP evidenciaram alterações histológicas pronunciadas incluindo necrose dos ápices das LDP, perda da arquitetura normal do tecido e presença de debris celulares. Observou-se regeneração de células epiteliais dentro das

áreas de necrose com presença de grande número de figuras mitóticas. Em contraste com os achados de WEISS et al. (1995), não foram encontrados trombos dentro desses cortes coletados de animais induzidos com o extrato de NP (GALEY et al., 1991).

Estudo examinando os efeitos diretos do extrato de NP nas ações contráteis da adrenalina em anéis de vasos digitais observou aumento da vasoconstrição quando comparado com anéis não expostos ao extrato. Ao expor os segmentos de vasos digitais a extratos de outras árvores, como por exemplo, pinheiro branco, cedro vermelho ou carvalho, foi observado que não ocorreu contração diferenciada para a epinefrina quando comparados com segmentos de vasos digitais expostos somente à ação da adrenalina (GALEY et al., 1990a).

1.2.3.e.c. Modelo da Frutana

O modelo de indução de laminite por sobrecarga de CHO é frequentemente associado à alta morbidade dos animais. Apesar disso, tornou-se o modelo de eleição para os estudos da laminite aguda particularmente, devido à sua similaridade com a sobrecarga de grãos, comumente relacionada aos casos de laminite clínica. Na tentativa de manter os aspectos clínicos do modelo diminuindo a morbidade, POLLITT & VAN EPS (2002) desenvolveram o modelo de indução da laminite por administração, de frutanas.

Frutanas são polímeros de frutose com ligações β -2,1 ou β -2,6, também denominadas frutoligossacarídeos ou inulina, extraídas das raízes da chicória (*Cichorium intybus*). A inulina não é digerida no trato gastrintestinal, porém é amplamente fermentada pela microbiota intestinal, resultando em ácidos graxos de cadeia curta. Neste modelo, observou-se que todos os eqüinos apresentaram sinais de laminite, sendo esse resultado mais consistente quando comparado aos dos modelos do CHO e do extrato de NP. Adicionalmente, os eqüinos apresentaram diarreia, piroxia, frequência cardíaca elevada e alterações hematológicas similares ao modelo da sobrecarga de CHO (POLLITT & VAN EPS, 2002). De forma geral, os autores sugerem que esse modelo é mais humanitário e mais efetivo que o modelo da sobrecarga de CHO, no entanto, estudos adicionais utilizando esse novo modelo ainda são necessários.

1.2.3.f. Tratamentos

Atualmente, numerosas e variadas terapias são empregadas na prevenção e tratamento da laminite, o que reflete a falta de conhecimento preciso da fisiopatologia dessa doença. Os tratamentos de eqüinos, acometidos pela laminite aguda, são direcionados a diferentes alterações inerentes ao processo fisiopatológico específico.

A laminite aguda deve ser considerada emergência médica e o tratamento, preferencialmente instituído antes do início dos sinais clínicos, focado na supressão de fatores predisponentes ou etiológicos, atenuação da severidade das lesões laminares permanentes, melhoria da hemodinâmica digital, normalização das forças de Starling, prevenção da instabilidade da falange distal dentro da cápsula do casco e, principalmente, combate à dor (STOKES, 2002; PARKS, 2003).

No sentido de instituir um tratamento preventivo para a laminite, os eqüinos considerados em risco devem ser monitorados. Uma vez feito isso, a prevenção pode incluir a administração de óleo mineral, fluidoterapia intravenosa, antibióticos parenterais, antiinflamatórios não-esteroidais, soro ou plasma hiperimune e polimixina B. Outros tratamentos preventivos incluem heparina, ácido acetilsalicílico, vasodilatadores, agentes reológicos, casqueamento e ferrageamento corretivos, baias com cama alta e suporte da ranilha. Muitas dessas medidas preventivas são, também, instituídas terapêuticamente (STOKES, 2002; PARKS, 2003).

Com base em grande número de pesquisas conduzidas para se medir as forças de Starling e a formação do edema laminar, uma das mais importantes considerações ao desenvolver um plano terapêutico e preventivo é tentar normalizar as forças digitais de Starling. A melhor abordagem para isto, quando necessário, é manter a pressão oncótica plasmática por meio da suplementação com plasma ou outra solução coloidal tal como a hidroxietila de amido (HES) (EADES et al., 2002). Deve-se ter cuidado na administração de qualquer terapia intravenosa em eqüinos com laminite aguda, uma vez que o volume intravascular pode perpetuar o desenvolvimento do edema laminar em casos com a hemodinâmica digital alterada. A maioria dos resultados de pesquisas dá suporte à teoria de que as alterações vasculares, mais notavelmente a hipoperfusão, são fatores cruciais que conduzem à falência das interdigitações laminares. Sugere-se

que os tratamentos sejam direcionados para conservar ou melhorar o fluxo sanguíneo digital e a perfusão laminar (STOKES, 2002; PARKS, 2003).

Os fármacos mais comumente utilizados para melhorar o fluxo sanguíneo digital são a acepromazina (0,03 a 0,06 mg/kg, IM a cada seis ou oito horas, por no mínimo três dias), isoxsuprina (1,2 mg/kg, via oral a cada 12 horas), e aplicação tópica de gliceril trinitrato (2 a 4 mg/h) (EADES et al., 2002). Em estudo conduzido com eqüinos sadios, observou-se que a administração de acepromazina melhorou o fluxo sanguíneo para o casco, enquanto o isoxsuprine e a pentoxifilina não alteram esse fluxo (INGLEFEHR & BAXTER, 1999). Muitos clínicos utilizam a isoxsuprine por ser uma substância sugerida por induzir vasodilatação, diminuição da viscosidade do sangue e agregação plaquetária (ERKERT & MACALLISTER, 2002). Experimentalmente, os doadores de NO, tais como o gliceril trinitrato, reduzem a claudicação e a freqüência da pulsação digital em pôneis com laminite experimental melhorando a perfusão digital (HINCKLEY et al., 1996a; HINCKLEY et al., 1996b). Em outro estudo, o gliceril trinitrato foi aplicado topicamente sobre a vasculatura digital palmar de eqüinos sadios sem melhorar a perfusão digital, uma vez que não houve mudanças na temperatura da superfície da muralha do casco (HOOF et al., 2002, SAMPAIO, 2003). A eficiência dos doadores de NO no tratamento da laminite eqüina face a complexidade da fisiopatologia desta doença permanece indefinida.

Sugere-se que a vasoconstrição, detectada no início da laminite, possa agir limitando a chegada de substâncias tóxicas derivadas do trato gastrintestinal através do sangue, as quais possuem efeitos diretos sobre as células das lâminas digitais. Assim, alguns investigadores e clínicos defendem que a vasodilatação possa não ser benéfica nos estágios prodrômicos da doença, de forma que, mergulhar o casco em gelo triturado ou água gelada possa ser indicado para prevenir a fase de vasodilatação (POLLITT, 1999). A adoção desse tratamento é tempo-dependente e precisará ser feito continuamente durante a fase prodrômica, antes do início do dano laminar. É provável que, uma vez que o gelo seja removido, vasodilatação e hiperemia reflexa poderão ocorrer. Como na maioria das vezes a fase prodrômica passa despercebida, a adoção deste tratamento se dá quando o dano laminar já se iniciou.

Os antiinflamatórios são indicados para diminuir o edema e a dor associados à laminite. A fenilbutazona parece ter os melhores efeitos antiinflamatório e analgésico que qualquer outro antiinflamatório-não-esteroidal comumente utilizado em eqüinos. Foi observado que esse fármaco, em particular, foi utilizado em aproximadamente 86% dos casos de laminite (SLATER et al., 1995). A posologia utilizada normalmente é a dose de 2,2 a 4,4 mg/kg IV ou PO a cada 12 horas.

Alternativamente, a flunixin meglumina pode ser administrada na dose de 0,5 a 1,1 mg/kg IV ou PO a cada oito ou 12 horas para interromper a produção de eicosanóides associada com a endotoxemia (EADES et al., 2002). Uma vez que a flunixin meglumina diminui a produção de eicosanóides na vigência da endotoxemia, ela tem sido frequentemente utilizado em casos de laminite aguda, enquanto os casos de laminite crônica são tratados com a administração de fenilbutazona (DOUWES & van der KOLK, 1998).

O cetoprofeno pode ser administrado na dose de 2,2 mg/kg IV a cada 12 horas. Considera-se que ele possua ação semelhante a flunixin meglumina, agindo na cascata do ácido aracdônico tanto na via da lipoxigenase quanto na via da ciclooxygenase (MacALLISTER et al., 1993) podendo reduzir a inflamação de uma forma mais eficiente que a flunixin meglumine e a fenilbutazona (BAXTER, 1996).

O DMSO, um antiinflamatório que seqüestra radicais hidroxila, diminui o edema e, por essa razão, tem sido utilizado para contrapor os efeitos da injúria de isquemia e reperfusão nos processos gastrintestinais. Deve ser administrado na dose de 0,1 a 1,0 g/kg IV, diluído em fluído poliônico com dextrose na concentração de 10 a 20%. Pode ser administrado a cada oito ou 12 horas (EADES et al., 2002). O DMSO tem sido utilizado no tratamento de trauma muscular, tendinite, laminite e artrite e pode potencializar os efeitos de outros fármacos (DOUWES & van der KOLK, 1998). Alguns clínicos preferem utilizar o DMSO topicamente no bordo coronário (EADES et al., 2002).

A ocorrência de microtrombos tem sido demonstrada na circulação laminar de eqüinos durante a laminite. Sendo assim, alguns clínicos preferem administrar heparina e/ou ácido acetilsalicílico para prevenção ou mesmo como agente trombolítico. A heparina é aplicada por via SC em doses que variam 20.000 a 40.000 UI/450 kg de PV, não existindo evidências que a administração de heparina previna o início da laminite,

uma vez que pesquisadores não encontraram diferença significativa na ocorrência de laminite entre eqüinos tratados profilaticamente com heparina e aqueles que não foram tratados (BELKNAP & MOORE, 1989).

O ácido acetilsalicílico administrado, na maioria das vezes, na dose de 10 a 20 mg/kg PO a cada 48 horas (EADES et al., 2002), inibe irreversivelmente a ciclooxigenase plaquetária e, por conseguinte, a produção de tromboxana, o que deve diminuir a agregação plaquetária e a vasoconstrição. WEISS et al. (1998b) avaliaram pôneis utilizando um análogo de peptídeo antagonista do receptor plaquetário e encontraram diminuição no desenvolvimento da laminite induzida por sobrecarga de CHO, evidenciando um papel importante da agregação plaquetária na fisiopatologia da doença.

Entre as medidas complementares de importância, ressaltam-se os esforços para reduzir as forças mecânicas e estabilizar a falange distal como imperativos no tratamento da laminite aguda. Exercícios podem exacerbar a separação das interdigitações laminares já comprometidas e devem ser evitados. A baia deve ser forrada com cama macia e alta, ou com areia ou outro material que forneça suporte para a rasilha. As escaras de decúbito são complicações comuns durante longos períodos em que o animal permanece deitado, por isso é necessário que se forneça a baia com material adequado e que sua manutenção seja realizada periodicamente.

O fornecimento de apoio mecânico efetivo para a falange distal pode evitar a separação das lâminas e melhorar a recuperação do animal (GOETZ, 1987). Este suporte mecânico deve ser instituído antes do aparecimento de dor nos cascos. O princípio da terapia de suporte do casco é estabilizar a falange distal e controlar a dor. As ferraduras convencionais concentram o estresse mecânico ao redor do perímetro do casco, ou seja, na muralha deste, favorecendo o prolapso da sola por entre a ferradura. Dessa maneira devem ser removidas, principalmente nos estágios iniciais da laminite. O apoio para a rasilha é um dos métodos mais efetivos de fornecer suporte para a falange distal e normalmente é instituído na tentativa de se diminuir o estresse geral sobre o dígito, reduzir a pressão na parte mais afetada do casco e evitar a pressão na sola pelo apoio de peso na superfície da falange distal (PARKS, 2003).

Os protocolos preventivos e terapêuticos adotados entre os clínicos devem se basear no estágio da doença em que se encontra o equino. As informações apresentadas acima, representam alguns dos métodos utilizados atualmente, mas com pesquisas futuras, tratamentos mais eficazes poderão ser desenvolvidos.

1.2.3.g. Prognóstico

Muitos eqüinos que demonstram sinais clínicos de laminite aguda e que recebem tratamento médico apropriado e imediato da condição predisponente e suporte mecânico do membro possuem condições de se recuperar completamente. Se as radiografias demonstrarem sinais de rotação da falange distal, o prognóstico da severidade e mesmo a sobrevivência deve ser reservado.

Eqüinos com menos de 5,5 graus de rotação evidente nas radiografias laterais retornam para o desempenho atlético; entretanto, eqüinos com mais de 11,5 graus de rotação não terão a mesma possibilidade (STICK et al., 1982). Animais com deslocamento distal ou afundamento da falange distal na cápsula do casco são mais prováveis de serem sacrificados do que aqueles sem deslocamento distal (HUNT, 1993; CRIPPS & EUSTACE, 1999b). Muitas vezes, eqüinos com laminite requerem tratamento prolongado e o prognóstico é grave por causa de dor recorrente, impossibilidade de apoio de peso nos membros acometidos e conseqüentemente decúbito prolongado, o que muitas vezes requer que sejam sacrificados por razões humanitárias. Em um estudo retrospectivo com eqüinos com laminite aguda, admitidos em hospitais veterinários universitários nos EUA, 75% não retornou à função atlética, e uma grande maioria foi humanitariamente sacrificada dentro de um ano após a doença ser diagnosticada, devido à falta de resposta à terapia ou ao desenvolvimento de complicações severas.

1.2.4. Hidróxido de Magnésio ($Mg(OH)_2$) e Hidróxido de Alumínio ($Al(OH)_3$)

O $Mg(OH)_2$ e o $Al(OH)_3$ são bases fracas que neutralizam íons hidrogênio de ácidos orgânicos normalmente presentes nos componentes alimentares ou produzidos durante a digestão e metabolismo dos nutrientes e por isso, são amplamente utilizados na manutenção do pH dentro da amplitude específica característica de cada agente

tamponante (STAPLE & LOUGH, 1989). O $Mg(OH)_2$ é pouco solúvel em água, sendo que sua suspensão oral, o leite de magnésia, é empregado como antiácido estomacal por neutralizar o excesso de ácido clorídrico (HCl) no suco gástrico. O $Al(OH)_3$ é muito usado em medicamentos antiácidos estomacais também por suas características tamponante e antiácida.

A capacidade de tamponamento de uma substância é função da relação entre o número de equivalentes de ácido ou base adicionados e a variação ocorrida nos valores de pH do meio, sendo mais alta quando o pH do meio for igual ao seu pKa. Normalmente, os agentes tamponantes oferecem resistência às mudanças de pH dentro de uma faixa de uma unidade de seu pKa (ARMENTANO & SOLORZANO, 1988).

Compostos contendo $Mg(OH)_2$ e o $Al(OH)_3$ são amplamente utilizados na espécie humana como substâncias antiácidas na prática clínica (WALAN, 1984; FLORENT et al., 1985; DOMSCHKE et al., 1986; KONTUREK et al., 1991; MATON & BURTON, 1999). Em eqüinos, a utilização de antiácidos compostos por $Mg(OH)_2$ e o $Al(OH)_3$ auxilia no aumento do pH gástrico de animais adultos (MURRAY & GRODINSKY, 1992; CLARK et al., 1996) e constituem alternativa terapêutica nos casos de úlcera gástrica em neonatos (LEWIS, 2003), sendo também indicados no tratamento de compactações do trato gastrintestinal dessa espécie (WHITE & DABAREINER, 1997).

Resultados de pesquisas com agente antiácido composto por $Mg(OH)_2$ e o $Al(OH)_3$ administrado por via oral em vacas saudáveis alimentadas com substitutos lácteos, sugerem aumento transitório do pH luminal abomasal (AHMED et al., 2002). A avaliação do pH e a verificação da capacidade de tamponamento de determinada substância são frequentemente utilizadas para se definir a necessidade de suplementação nutricional para o controle das alterações do equilíbrio ácido-base no rúmen de bovinos, caracterizado pela instabilidade do processo fermentativo (MILLER et al., 1993). O $Mg(OH)_2$ e o carbonato de Mg ($MgCO_3$), quando adicionados na dieta de vacas leiteiras, mostraram-se efetivos em aumentar o pH ruminal (SCHAEFER et al., 1982).

Estudos com o óxido de magnésio (MgO) demonstraram que, apesar da sua função como substância tamponante no meio ruminal e intestinal ainda não ser completamente estabelecida, ele tem se mostrado eficiente no aumento do pH ruminal auxiliando na melhoria do metabolismo (EROMAN et al., 1982; TEH et al., 1987; ENSMINGER et al., 1990), sendo que essa eficiência é diretamente proporcional à acidez do meio, uma vez que o MgO parece apresentar melhor eficiência tamponante em meio intestinal devido ao pH intestinal mais ácido, que oferece um ambiente melhor para a atividade da α -amilase, uma enzima essencial na hidrólise do amido (WHEELER & NOLLER, 1976; WILLIAM & WHEELER, 1980).

1.3. REFERÊNCIAS¹

ACKERMAN, N. et al. Angiographic appearance of the normal equine foot and alterations in chronic laminitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.166, p.58-62, 1975.

ADAIR, H.S. et al. Laminar microvascular flow, measured by means of laser Doppler flowmetry, during the prodromal stages of black walnut-induced laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.862-868, 2000.

AHMED, A.E.; CONSTABLE, P.D.; MISK, N.A. Effect of an orally administered antacid agent containing aluminum hydroxide and magnesium hydroxide on abomasal luminal pH in clinically normal milk-fed calves. *J Am Vet Med Assoc.* v.1, n.220, p.74-79, 2002.

ALFORD, P. et al. A multicenter, matched case-control study of risk factors for equine laminitis. *Prev. Vet. Med.*, v.49, p.209-222, 2001.

ALLEN, D.J. Overview of Pathogenesis of Laminitis – Models and Theories. *Proc. Equine Laminitis Research Meeting and Panel.*, p.9-23, 2004.

ALLEN, D.J.; KORTHUIS, R.J.; CLARK, E.S. Capillary permeability to endogenous macromolecules in the equine digit. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, p.1609-1612, 1988a.

ALLEN, D.J.; KORTHUIS, R.J.; CLARK, E.S. Evaluation of Starling forces in the equine digit. *J. Appl. Physiol.*, v.64, p.1580-1583, 1988b.

ALLEN, D.J. et al. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.1930-1934, 1990.

ARMENTANO, L.E.; SOLORZANO, L.C. Choice of buffers should be dipped on diet, environment. *Feedstuffs*, v.60, n.3, p.19-62, 1988.

BACKUS, N.D. Lameness in the horse, with special reference to acute laminitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.91, p.64-72, 1937.

¹ De acordo com as normas da ABNT NBB 6023, agosto de 2002.

BAXTER, G.M. Equine laminitis caused by distal displacement of the distal phalanx: 12 cases (1976-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.189, p.326-329, 1986.

BAXTER, G.M. Diagnosing and treating acute laminitis. *Vet. Med.*, v.91, n.10, p.940-952, 1996.

BAXTER, G.M. et al. *In vitro* reactivity of digital arteries and veins to vasoconstrictive mediators in healthy horses and in horses with early laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, 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. *Vet. Surg.*, v.18, p.221-226, 1989b.

BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N. Evaluation of heparin for prophylaxis of equine laminitis: 71 cases (1980-1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.195, p.505-507, 1989.

BITAR, M.S. Insulin and glucocorticoid-dependent suppression of the IGF-I system in diabetic wounds. *Surgery*, v.127, p.687-695, 2000.

BOTTOMS, G.D. et al. Endotoxin-induced hemodynamic changes in ponies: effects of flunixin meglumine. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, p.1514-1518, 1981.

BOWKER, R.M. et al. Functional anatomy of the cartilage of the distal phalanx and digital cushion in the equine foot and a hemodynamic flow hypothesis of energy dissipation. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.961-968, 1993.

BUJALASKA, I.J.; KUMAR, S.; STEWART, P.M. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet*, v.349, p.1210-1213, 1997.

CHALDAKOV, G.N. et al. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr. Pharm. Des.*, v.9, p.1023-1031, 2003.

CIMMINIELLO, C. et al. Endothelin, vasoconstriction, and endothelial damage in Raynaud's phenomenon. *Lancet*, v.337, p.114-115, 1991.

CLARK, E.S.; GANTLEY, B.; MOORE, J.N. Effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin on systemic haemodynamics in conscious horses. *Equine Vet. J.*, v.23, p.18-21, 1991.

CLARK, C.K. et al. Effect of aluminum hydroxide/magnesium hydroxide antacid and bismuth subsalicylate on gastric pH in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.208, n.10, p.1687-1691, 1996.

COFFMAN, J.R. et al. Characterization of refractory laminitis. ANNUAL MEETING OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, v.18, p.351-358, 1972.

CORRY, D.B., TUCK, M.L. Selective aspects of the insulin resistance syndrome. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, v.10, p.507-514, 2001.

COSENTINO, F.; LUSHER, T.F. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.32, n.3, p.54-61, 1998.

CRIPPS, P.J.; EUSTACE, R.A. Radiological measurements from the feet of normal horses with relevance to laminitis. *Equine Vet. J.*, v.31, p.427-432, 1999a.

CRIPPS, P.J.; EUSTACE, R.A. Factors involved in the prognosis of equine laminitis in the UK. *Equine Vet. J.*, v.31, p.433-442, 1999b.

DAVIES, N.M.; WRIGHT, M.R.; JAMALI, F. Anti-inflammatory drug-induced small intestinal permeability: the rat is a suitable model. *Pharm. Res.*, v.11, p.1652-1656, 1994.

DOMSCHKE, W. et al. Antacids and gastric mucosal protection. *Scand J. Gastroenterol Suppl.*, v.125, p.144-150, 1986.

DORN, C.R. et al. Castration and other factors affecting the risk of equine laminitis. *Cornell Vet.*, v.65, p.57-64, 1975.

DOUWES, R.A., VAN DER KOLK, J.H. Dimethylsulfoxide (DMSO) in horses: a literature review. *Tijdschr Diergeneeskd*, v.123, p.74-80, 1998.

DOWD, P.M. et al. Raynaud's phenomenon, calcitonin generelated peptide, endothelin, and cutaneous vasculature. *Lancet*, v.336, p.1014, 1990.

DUNCAN, S.G. et al. Alterations in coagulation and hemograms of horses given endotoxin for 24 hours via hepatic portal infusions. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, p.1287-1292, 1985.

DUNLOP, R.H.; WILLIAMS, D.J. *Veterinary medicine: an illustrated history*. St. Louis: Mosby, 1996.

EADES, S.C.; HOLM, A.S.; MOORE, R.M. A review of the pathophysiology and treatment of acute laminitis: pathophysiologic and therapeutic implications of endothelin-1. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract*, v.48, p.353-361, 2002.

EATON, S.A. et al. Digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis induced by an aqueous extract of nogueira preta (*Juglans nigra*) in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.1338-1344, 1995.

EHRHART-BORNSTEIN, M. et al. Human adipocytes secretemineralocorticoid-releasing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.100, p.14211-14216, 2003.

EKFALCK, A.; RODRIGUEZ, H.; OBEL, N. Histopathology in post-surgical laminitis with a peracute course in a horse. *Equine Vet. J.*, v.24, n.4, p.321-324, 1992.

ENSMINGER, M.E.; OLDFIELD, J.E.; HEINEMANN, W.W. *Feeds & Nutrition*. 2.ed. California: Ensminger, p. 491-526, 1990.

ERKERT, R.S.; MACALLISTER, C.G. Isoxsuprine hydrochloride in the horse: a review. *J. Vet. Pharmacol Ther.*, v.25, p.81-87, 2002.

EROMAN, R.A.; HEMKEN, R.W.; BULL, L.S. Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: effects on production, acid-base metabolism, and digestion. *J. Dairy Sci.*, v.65, n.7, p.712-731, 1982.

EYRE, P.; ELMES, P.J.; STRICKLAND, S. Corticosteroid-potentiated vascular responses of the equine digit: a possible pharmacologic basis for laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, n.1, p.135-138, 1979.

FAGLIARI, J.J. et al. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.1234-1237, 1998.

FIELD, J.R.; JEFFCOTT, L.B. Equine laminitis – another hypothesis for pathogenesis. *Medical Hypotheses*, v.30, p.203-210, 1989.

FLORENT, C.; PFEIFFER, A.; BERNIER, J.J. The weakness of the gastric mucosa barrier: a new concept. *Gastroenterol Clin. Biol.*, v.9, n.12, pt. 2, p.65-71, 1985.

FONTAINE, G.L. et al. Expression of interleukin-1beta in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.714-720, 2001.

GALEY, F.D. et al. Effect of an aqueous extract of nogueira preta (*Juglans nigra*) on isolated equine digital vessels. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.83-88, 1990a.

GALEY, F.D. et al. Gamma scintigraphic analysis of the distribution of perfusion of blood in the equine foot during nogueira preta (*Juglans nigra*)-induced laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.688-695, 1990b.

GALEY, F.D. et al. Nogueira preta (*Juglans nigra*) toxicosis: a model for equine laminitis. *J. Comp. Pathol.*, v.104, p.313-326, 1991.

GARNER, H.E. et al. Equine laminitis and associated hypertension: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.166, p.56-57, 1975a.

GARNER, H.E. et al. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. *Am. J. Vet. Res.*, v.36, p.441-444, 1975b.

GARNER, H.E. et al. Lactic acidosis: a factor associated with equine laminitis. *J. Anim. Sci.*, v.45, p.1037-1041, 1977.

GARNER, H.E. et al. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet. J.*, v.10, p.249-252, 1978.

GOETZ, T.E. Anatomic, hoof, and shoeing considerations for the treatment of laminitis in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.190, p.1323-1332, 1987.

HARKEMA, J.R.; ROBINSON, N.E.; SCOTT, J.B. Cardiovascular, acid-base, electrolyte, and plasma volume changes in ponies developing alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.39, p.741-744, 1978.

HINCKLEY, K.A. et al. Glyceryl trinitrate enhances nitric oxide mediated perfusion within the equine hoof. *J. Endocrinol.*, v.151, p.R1-8, 1996a.

HINCKLEY, K.A. et al. Nitric oxide donors as treatment for grass induced acute laminitis in ponies. *Equine Vet. J.*, v.28, p.17-28, 1996b.

HOFF, T.K.; HOOD, D.M.; WAGNER, I.P. Effectiveness of glyceryl trinitrate for enhancing digital submural perfusion in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.63, p.648-652, 2002.

HOFFMANN, K.L. et al. Sonographic observations of the peripheral vasculature of the equine thoracic limb. *Anat. Histol. Embryol.*, v.28, p.281-289, 1999.

HOOD, D.M. Laminitis in the horse. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.15, p.287- 294, 1999a.

HOOD, D.M. The mechanisms and consequences of structural failure of the foot. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.15, p.437-461, 1999b.

HOOD, D.M. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.15, p.321-343, 1999c.

HOOD, D.M.; AMOSS, M.S.; HIGHTOWER, D. Equine laminitis I: Radioisotopic analysis of the hemodynamics of the foot during the acute disease. *J. Equine Med. Surg.*, v.2, p.439-444, 1978.

HOOD, D.M.; AMOSS, M.S.; GROSENBAUGH, D.A. Equine laminitis: a potential model of Raynaud's phenomenon. *Angiology*, v.41, p.270-277, 1990.

HOOD, D.M. et al. The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. *J. Vet. Intern Med.*, v.7, p.228-234, 1993.

HOOD, D.M. et al. Digital loading patterns in the normal standing horse. *The Hoof Project*, 1997.

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. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.1167-1172, 2001.

HSUEH, W.A.; LAW, R.E. Diabetes is a Vascular disease. *J. Investigative Med.*, v.46, p.387-390, 1998.

HUNT, R.J. The pathophysiology of acute laminitis. *Compend Cont. Educ. Pract Vet.*, v.13, p.1003-1010, 1991.

HUNT, R.J. A retrospective evaluation of laminitis in horses. *Equine Vet. J.*, v.25, p.61-64, 1993.

HUNT, R.J.; ALLEN, D.; MOORE, J.N. Effect of endotoxin administration on equine digital hemodynamics and starling forces. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.1703-1707, 1990.

HUNT, R.J.; BRANDON, C.I.; MCCANN, M.E. Effects of acetylpromazine, xylazine, and vertical load on digital arterial blood flow in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.55, p.375-378, 1994.

INGLE-FEHR, J.E.; BAXTER, G.M. The effect of oral isoxsuprine and pentoxifylline on digital and laminar blood flow in healthy horses. *Vet. Surg.*, v.28, p.154-160, 1999.

JOHNSON, P.J. The equine metabolic syndrome (peripheral Cushing's syndrome). *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract*, v.18, n.2, p.271-293, 2002.

JOHNSON, P.J. et al. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. *Vet. Rec.*, v.142, p.392-396, 1998.

JOHNSON, P.J. et al. Glucocorticoids and laminitis in the horse. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract*, v.18, n.2, p.219-236, 2002.

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

KAINER, R.A. Clinical anatomy of the equine foot. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.5, p.1-27, 1989.

KAMEYA, T. et al. Histopathogenesis of thickening of the hoof wall laminae in equine laminitis. *JPN J. Vet. Sci.*, v.42, n.3, p.361-371, 1980.

KATWA, L.C. et al. Expression of endothelin in equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v.31, p.243-247, 1999.

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

KIZILTAS, S. et al. Corticosteroid therapy augments gastroduodenal permeability to sucrose. *Am. J. Gastroenterol.*, v.93, p.2420-2425, 1998.

- KONTUREK, S.J. et al. Intra-gastric pH in the gastroprotective and ulcer-healing activity of aluminum-containing antacids. *Digestion*, v.49, n.3, p.140-150, 1991.
- KRUEGER, A.S. et al. Ultrastructural study of the equine cecum during onset of laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.1804-1812, 1986.
- LEWIS, S. Gastric ulceration in an equine neonate. *Can. Vet. J.*, v.44, n.5, p.420-421, 2003.
- MACALLISTER, C.G. et al. Comparison of adverse effects of phenylbutazone, flunixin meglumine, and ketoprofen in horses *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.202, n.1, p.71-77, 1993.
- MARKS, G. Makroskopische, licht-und elektronenoptische untersuchung zur morphologie des hyponchiums bei der hufrehe des pherdes. Berlin, 1984.
- MATON, P.N.; BURTON, M.E. Antacids revisited: a review of their clinical pharmacology and recommended therapeutic use. *Drugs*, v.57, n.6, p.855-870, 1999.
- MCCOY, B.J.; DIEGELMANN, R.F.; COHEN, I.K. *In vitro* inhibition of cell growth, collagen biosynthesis and prolylhydroxylase activity by triamcinalone acetone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.153, p.216-222, 1980.
- MEDDINGS, J.B.; SWAIN, M.G. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology*, v.119, p.1019-1028, 2000.
- MILLER, T.P. et al. Influence of dietary buffer value index on the ruminal milieu of lactating dairy cows fed soya-hum silage and grain. *J. Dairy Sci.*, v.76, n.11, p.3571-3579, 1993.
- MINNICK, P.D. et al. The induction of equine laminitis with an aqueous extract of the heartwood of nogueira preta (*Juglans nigra*). *Vet. Hum. Toxicol.*, v.29, p.230-233, 1987.

- MOLYNEUX, G.S. et al. The structure, innervation and location of arteriovenous anastomoses in the equine foot. *Equine Vet. J.*, v.26, p.305-312, 1994.
- MOORE, J.N. et al. Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis: a preliminary report. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.722-723, 1979.
- MOORE, J.N.; GARNER, H.E.; COFFMAN, J.R. Haematological changes during development of acute laminitis hypertension. *Equine Vet. J.*, v.13, p.240-242, 1981.
- MOORE, J.N.; ALLEN, D.J.; CLARK, E.S. Pathophysiology of acute laminitis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.5, p.67-72, 1989.
- MOORE, J.N.; ALLEN, D. A guide to equine acute laminitis. In: Trenton, N.J. *Veterinary learning systems*, p.40, 1995.
- MOSTAFA, M.B. Studies on experimental laminitis in the horse. Cairo: Cairo University, 1986.
- MUNGALL, B.A.; KYAW-TANNER, M.; POLLITT, C.C. *In vitro* evidence for a bacterial pathogenesis of equine laminitis. *Vet. Microbiol.*, v.79, p.209-223, 2001.
- MURRAY, M.J.; GRODINSKY, C. The effects of famotidine, ranitidine and magnesium hydroxide/aluminium hydroxide on gastric fluid pH in adult horses. *Equine Vet. J. Suppl.* v.11, p.52-55, 1992.
- OBEL, N. *Studies on the histopathology of acute laminitis*. Sweden: Almquist and Wiskells, 1948.
- PARKS, A.H. Treatment of acute laminitis. *Equine Vet. Educ.*, v.15, n.5, p.273-280, 2003.
- PELOSO, J.G. et al. Case-control study of risk factors for the development of laminitis in the contralateral limb in Equidae with unilateral lameness. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.209, p.1746-1749, 1996.

POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v.28, p.38-46, 1996.

POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract*, v.45, p.188-192, 1999.

POLLITT, C.C.; MOLYNEUX, G.S. A scanning electron microscopical study of the dérmica microcirculation of the equine foot. *Equine Vet. J.*, v.22, p.79-87, 1990.

POLLITT, C.C.; DAVIES, C.T. Equine laminitis: its development coincides with increased sublamellar blood flow. *Equine Vet. J.*, Suppl., p.125-132, 1998.

POLLITT, C.C.; VAN EPS AW. *Equine laminitis; a new induction model based on alimentary overload with fructan*. In: INTERNATIONAL EQUINE COLIC RESEARCH SYMPOSIUM, v.7, p.87, 2002.

POLZER, J.; SLATER M.R. Age, breed, sex and seasonality as risk factors for equine laminitis. *Prev. Vet. Med.*, v.29, p.179-184, 1997.

PRASSE, K.W. et al. Evaluation of coagulation and fibrinolysis during the prodromal stages of carbohydrate-induced acute laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.1950-1955, 1990.

RATZLAFF, M.H.; SHINDELL, R.M.; DEBOWES, R.M. Changes in digital venous pressures of horses moving at the walk and trot. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, p.1545-1549, 1985.

RIEGEL, R.J.; HAKOLA, S.E. *Illustrated atlas of clinical equine anatomy and common disorders of the horse*. Marysville, Ohio: Equistar Publications, 1997.

ROBERTS, E.D.; OCHOA, R.; HAYNES, P.F. Correlation of dermal-epidermal laminar lesions of equine hoof with various disease conditions *Vet. Pathol.*, v.17, n.6, p.656-660, 1980.

ROBINSON, N.E. et al. Digital vascular responses and permeability in equine alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.37, p.1171-1176, 1976.

ROSENSTEIN, D.S.; BOWKER, R.M.; BARTLETT, P.C. Digital angiography of the feet of horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.255-259, 2000.

RUBANYI, G.M.; POLOKOFF, M.A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiol., and pathophysiol. *Pharmacol. Rev.*, v.46, p.325-415, 1994.

SACK, W.O. Nerve distribution in the metacarpus and front digit of the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.167, p.298-305, 1975.

SAMPAIO, R.C.L. *Laminite eqüina experimental; efeito da triniglicerina durante a fase prodrômica. Avaliação clínica, laboratorial e histopatológica*. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, 2003. 66 p. Dissertação (Mestrado).

SCHAEFER, D.M. et al. Neutralization of acid in the rumen by magnesium oxide and magnesium carbonate. *J. Dairy Sci.*, v.65, n.5, p.732-739, 1982.

SCHNEIDER, D.A. et al. Palmar digital vessel relaxation in healthy horses and in horses given carbohydrate. *Am. J. Vet. Res.*, v.60, p.233-239, 1999.

SCHOTT, H.C. Pituitary pars intermedia dysfunction: equine Cushing's disease. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, v.18, n.2, p.237-270, 2002.

SCOTT, E.A.; THRALL, D.E.; SANDLER, G.A. Angiography of equine metacarpus and phalanges: alterations with medial palmar artery and medial palmar digital artery ligation. *Am. J. Vet. Res.*, v.37, p.869-873, 1976.

SECKL, J.R. et al. Glucocorticoids and 11betahydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Prog. Horm. Res.*, v.59, p.359-393, 2004.

SLATER, M.R.; HOOD, D.M.; CARTER, G.K. Descriptive epidemiological study of equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v.27, p.364-367, 1995.

SODERHOLM, J.D.; PERDUE, M.H. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v.280, p.G7-G13, 2001.

SPROUSE, R.F.; GARNER, H.E.; GREEN, E.M. Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate induced laminitis. *Equine Vet. J.*, v.19, p.25-28, 1987.

STAPLE, C.R.; LOUGH, D.S. Efficacy of supplemental dietary neutralizing agent for lactating dairy cows: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, p.277-303, 1989.

STICK, J.A. et al. Pedal bone rotation as a prognostic sign in laminitis of horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.180, p.251-253, 1982.

STOKES, A.M. et al. Comparison of effect of two endothelin antagonists on *In vitro* responses of palmar digital arterial and venous rings to endothelin-1 in normal horses. *Am. J. Vet. Res.*, 2002a.

STOKES, A.M. et al. *In vitro* responses of palmar digital vessel rings from horses with naturally-acquired laminitis to endothelin-1. *Am. J. Vet. Res.*, 2002b.

STOKES, A.M. *In vitro* responses of palmar digital vessel rings from horses with naturally-acquired laminitis to endothelin-1. Baton Rouge: Louisiana State University, School of Veterinary Medicine, 2003. 303 p. Tese (Doutorado).

TEH, T.H.; HEMKEM, R.W.; BREMEL, D.H.; HARMONET, R.J. Comparison of buffers on rumen functions, turnover rate and gastric secretion in Friesian steers. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v.17, n.4, p.257-270, 1987.

THOMASSIAN A. *Enfermidades dos cavalos*. São Paulo: Varela, p.643, 1997.

TRUE, R.G; LOWE, J.E.; HEISSEN, J. et al. Black Walnut shavings as a cause of acute laminitis. 24th Annual Convention of AAEP, 1978, St. Louis, Missouri, Proceedings..., p.511-516, 1979.

VENUGOPAL, C.S. et al. Role of endothelium and nitric oxide in the response of equine colonic arterial rings to vasoconstrictor agents. *Vet. Surg.*, v.26, p.182-188, 1997.

VENUGOPAL, C.S. et al. *In vitro* pharmacologic effect of two endothelin-1 antagonists on equine colonic arteries and veins. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.154-159, 2001.

WAGNER, I.P., HEYMERING H. Historical perspectives on laminitis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.49, n.15, p.295-309, 1999.

WALAN, A. Antacids and anticholinergics in the treatment of duodenal ulcer. *Clin. Gastroenterol.*, v.13, n.2, p.473-499, 1984.

WEISS, D.J. et al. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.58, p.1376-1380, 1990.

WEISS, D.J.; TRENT, A.M.; JOHNSTON, G. Prothrombotic events in the prodromal stages of acute laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.986-991, 1995.

WEISS, D.J. et al. Transient alteration in intestinal permeability to technetium Tc99m diethylenetriaminopentaacetate during the prodromal stages of alimentary laminitis in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.1431-1434, 1998a.

WEISS, D.J. et al. Effect of a competitive inhibitor of platelet aggregation on experimentally induced laminitis in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.814-817, 1998b.

WEISS, D.J. et al. *In vitro* evaluation of intraluminal factors that may alter intestinal permeability in ponies with carbohydrate-induced laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.858-861, 2000.

WHEELER, W.E.; NOLLER, C.H. Limestone buffers in complete fixed rations for dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, Lafayette, v.59, n.10, p.1788-1793, 1976.

WHITE, N.A.; DABAREINER, R.M. Treatment of impaction colics. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.13, n.2, p.243-259, 1997.

WILLIAM, E.; WHEELER, W.E. Effect of limestone buffers on digestibility of complete diets and on performance by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, Lafayette, v.63, n.11, p.1848 - 1848, 1980.

ZAMORA, M.R.; O'BRIEN, R.F.; RUTHERFORD, R.B. et al. Serum endothelin-1 concentrations and cold provocation in primary Raynaud's phenomenon. *Lancet*, v.336, p.1144-1147, 1990.

CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DO $\text{Al}(\text{OH})_3$ E DO $\text{Mg}(\text{OH})_2$ NOS SINAIS CLÍNICOS, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS E LÍQUIDO PERITONEAL DE EQUÍNOS COM LAMINITE INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR SOBRECARGA DE CARBOIDRATO.

RESUMO - Objetivou-se avaliar o desenvolvimento clínico da laminite induzida por sobrecarga de carboidrato (CHO) em eqüinos tratados ou não com solução tampão composta por $\text{Al}(\text{OH})_3$ e $\text{Mg}(\text{OH})_2$, administrada por via intracecal. Foram utilizados 23 eqüinos sadios, divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle (água + salina, GAS, n=5); controle tampão (água + tampão, GAT, n=6); controle carboidrato (CHO + salina, GCS, n=6); grupo carboidrato-tampão (CHO + tampão, GCT, n=6). Os eqüinos foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial antes da administração da solução salina ou do carboidrato (T0) e 8, 12, 24 e 48 horas após (T8, T12, T24 e T48). A solução tampão foi administrada 8 horas após a administração do CHO através de cânula cecal. Foram avaliados: temperatura retal (TR), frequência respiratória (FR), pressão arterial (P_A), tempo de preenchimento capilar (TPC), frequência cardíaca (FC), coloração das mucosas (MM), motilidade cecal (MC) e grau de claudicação segundo OBEL. Avaliaram-se ainda as contagens totais de eritrócitos e leucócitos e diferencial de leucócitos, o hematócrito, a taxa de proteínas totais e do fibrinogênio, a concentração de hemoglobina, as atividades das enzimas AST, CK, FA, a taxa de glicose e do lactato, eletrólitos sanguíneos e a concentração de óxido nítrico (NO) do sangue jugular e do líquido peritoneal (LP). A densidade e o pH do LP também foram mensurados. Os animais que desenvolveram a enfermidade tiveram sinais de claudicação condizente com o grau 1 de OBEL, de ocorrência mais tardia no grupo que recebeu solução tampão (GCT). As alterações clínicas foram mais precoces no GCT do que no GCS, entre elas depressão, diarreia, aumento da motilidade cecal, mucosas hiperêmicas, aumento do TPC e sinais de desconforto abdominal mais evidente. Ambos os grupos expostos a sobrecarga de CHO exibiram alterações laboratoriais semelhantes, características deste modelo experimental. Foi observado que a administração cecal de solução tampão atrasou o início da claudicação na laminite induzida por sobrecarga de

CHO, no entanto, não preveniu ou evitou as alterações clínicas e laboratoriais induzidas pelo CHO. O atraso na manifestação da claudicação sugere que a administração de solução tampão poderá constituir terapêutica auxiliar nos casos de ingestão excessiva de CHO por eqüinos.

Palavras-chave: carboidrato, eqüino, laminite.

INFLUENCE OF ALUMINUM HYDROXIDE (Al(OH)₃ AND MAGNESIUM HYDROXIDE ANTACID (Mg(OH)₂) ON CLINICAL SIGNS, PERITONEAL FLUID, AND HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS IN HORSES WITH LAMINITIS EXPERIMENTALLY INDUCED BY CARBOHYDRATE OVERLOAD

SUMMARY - The main propose of this study was to compare the clinical development of CHO overload-induced laminitis in horses treated with buffer solution composed of Al(OH)₃ and Mg(OH)₂. intracecally administered. Horses treated with saline solution served as the control group. Twenty three healthy horses were studied. A cecal cannula was surgically placed in all horses and they were divided in four treatment groups: negative control (WS, n=5); positive buffer control (WB, n=6); CHO-induced laminitis (CS, n=6); and CHO-induced laminitis with buffer treatment (CB, n=6). In the buffer treated groups, buffer was administered 8 hours after the induction of laminitis. Horses were submitted to clinical and laboratorial evaluation before (T0) and after saline or CHO administration, at 8, 12, 24 and 48 hours (T8, T12, T24 e T48). The clinical evaluation consisted in respiratory and heart rate, body (rectal) temperature, blood arterial pressure, capillary refill time and mucosa color, cecal motility, and lameness/laminitis degree following the OBEL scale. The laboratorial evaluation included the differential count for leucocytes and erythrocytes, hematocrit, total protein, fibrinogen, concentration of hemoglobin, enzymes' activities (AST, CK, FA,), glucose and lactate rates, electrolytes and NO concentration in the blood and peritoneal liquid. The peritoneal density and pH were also measured as well. All CHO-treated horses developed laminitis (degree 1), but it was significantly delayed in the CB group. However, the CB group showed clinical alterations earlier than CS group (depression, diarrhea, increased cecal motility, hyperemic MM, prolonged CRT, and more evident signs of abdominal discomfort). Both groups that were exposure to the CHO overload showed similar laboratorial changes which are particular to this experimental model. The intracecal buffer administration delayed signs of lameness in horses with CHO-induced laminitis; however, it did not prevent the hematological and biochemical alterations induced by the carbohydrate. The delay in the onset of lameness observed in this study

Key words: carbohydrate, equine, laminitis.

2.1. INTRODUÇÃO

A laminite aguda é uma doença altamente debilitante, sendo uma das principais causas de claudicação pela dor severa que induz nos eqüinos. Inúmeros são os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da laminite, entre eles, doenças gastrintestinais de diferentes origens, ingestão excessiva de CHO, retenção de placenta, metrite e outras doenças normalmente acompanhadas por endotoxemia (SLATER et al., 1995).

Atualmente, existem duas teorias principais em relação à fisiopatologia da laminite, a vascular e a enzimática. A teoria vascular postula que alterações no fluxo sanguíneo envolvendo hipoperfusão devido à venoconstrição, edema laminar e a abertura de anastomoses arteriovenosas resultam em isquemia e morte celular levando a separação das lâminas dérmicas e epidérmicas e, eventualmente, rotação e/ou afundamento da falange distal dentro da cápsula do casco (GARNER et al., 1975, ROBINSON et al., 1976; HOOD et al., 1978; ALLEN et al., 1990). A teoria enzimática afirma que o início precoce do colapso ou separação da membrana basal é causado pelo aumento na síntese de enzimas endógenas estimulado por fatores ou toxinas transportados pelo sangue, levando a separação das lâminas dérmicas e epidérmicas (BAILEY et al., 2004). No entanto, várias interações entre ambas indicam que elas não são mutuamente exclusivas.

Apesar do grande número de pesquisas relativas à prevenção e ao tratamento da laminite, a sua fisiopatologia complexa deixa em aberto algumas questões sobre o mecanismo dessa doença. O elo entre a progressão do processo intestinal mórbido, em especial o ceco, com os mecanismos que envolvem o casco, provavelmente seja o ponto chave para o entendimento da fisiopatologia dessa doença. Entender as mudanças no conteúdo e na mucosa intestinal poderá capacitar o desenvolvimento de tratamentos e estratégias mais efetivas (BAILEY et al., 2004).

A sobrecarga de CHO tem sido o modelo experimental de indução de laminite aguda mais utilizado para estudar as alterações envolvidas nesta doença. Uma vez que a flora intestinal do ceco é exposta aos CHO fermentáveis, favorecendo o crescimento exacerbado na população de bactérias Gram-positivas, ocorre aumento na produção de ácido láctico. O excesso de ácido láctico diminui o pH, causando a morte de bactérias da microflora cecal, entre elas, bactérias Gram-negativas (GARNER et al., 1977; GARNER

et al., 1978; BAILEY et al., 2002). O pH cecal baixo pode, ainda, induzir alterações na permeabilidade da mucosa intestinal permitindo o acesso de vários componentes com peso molecular alto para a circulação sistêmica, incluindo moléculas de endotoxinas (WEISS et al., 2000) que chegam, dessa maneira, à microcirculação digital.

Acredita-se que as exotoxinas de *Streptococcus* spp, especialmente *Streptococcus bovis*, uma bactéria Gram-positiva encontrada na microbiota cecal normal possa causar a ativação excessiva das enzimas MMP-2 e MMP-9 na laminite aguda, levando à digestão da lâmina e dos colágenos tipo IV e VII constitutivos da membrana basal do casco e conseqüentemente, ruptura da interação entre as lâminas dérmica e epidérmica (GARNER et al., 1978; POLLITT & DARADKA, 1998; POLLITT, 1999; MUNGALL et al., 2001).

Vários estudos sugeriram que ocorre aumento na produção de aminas vasoativas em modelos de sobrecarga de CHO *in vitro*, podendo este aumento estar associado com a proliferação das bactérias Gram-positivas (BAILEY et al., 2002). Estas aminas produzidas pela descarboxilação dos aminoácidos pelas bactérias cecais (RICE et al., 1976) podem induzir vasoconstrição devido às suas semelhanças estruturais com aminas endógenas vasoconstritoras, tais como a serotonina e as catecolaminas.

Os tratamentos são direcionados para a causa primária da doença, considerado-a uma situação de emergência. Todavia, devido ao caráter multifatorial da doença, os aspectos terapêuticos tornaram-se complexos devido aos numerosos eventos secundários. Por isso, existe muita controvérsia com relação ao tipo de tratamento a ser adotado. Basicamente, os tratamentos enfatizam a eliminação da causa primária e envolvem a administração de analgésicos, antiinflamatórios e proteção mecânica da ranilha. A administração de óleos emolientes fecais para combater a sobrecarga de CHO, fluidoterapia intravenosa, antibióticos, vasodilatadores, anticoagulantes e proteção do casco são complementares, conforme a etiologia e a fase da doença. Como medida preventiva, é importante identificar os fatores predisponentes relacionados à causa primária quase sempre devido à ocorrência de distúrbios gastrintestinais causadores de endotoxemia ou sepse (HINCKLEY et al., 1996b; VENUGOPAL et al., 2001).

No entanto, muitas das medidas terapêuticas adotadas poderão ser paliativas. Na maioria das vezes, os regimes terapêuticos são baseados em experiências clínicas, no tempo de curso ou estágio da doença. Apesar da existência de dados relacionando as alterações metabólicas com as mudanças da microflora e do meio cecal com a fisiopatologia da laminite (BAILEY et al., 2002), não existe informação sobre o uso de medidas profiláticas ou terapêuticas para restabelecer ou mesmo manter a função cecal.

A hipótese aqui estudada foi que a aplicação de uma solução tampão poderia minimizar os sinais observados em eqüinos expostos à sobrecarga de CHO. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento clínico da laminite induzida por sobrecarga de CHO após a administração ou não de solução tampão composta de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e $\text{Mg}(\text{OH})_2$ por via intracecal.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Animais

Foram utilizados 23 eqüinos, nove machos, castrados e 14 fêmeas não-gestantes, sem raça definida, adultos, hípidos, com idades variando de três a nove anos, pesando entre 200 e 410 kg e com escore corporal de três a quatro, segundo SPEIRS (1997). Os animais foram desverminados com 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ivermectina² e permaneceram alojados em piquetes por uma semana. Após esse período, os animais foram submetidos a exame clínico e distribuídos entre os grupos experimentais³.

2.2.1.a. Preparo dos Animais

Os animais foram submetidos a implantação cirúrgica de cânula cecal⁴ (URIBE et al., 2004). O estudo propriamente dito teve início 30 dias após a fixação da cânula. Durante esse período, os animais foram mantidos em baias individuais e tiveram a dieta padronizada com ração comercial⁵ (na quantidade de 1% do peso corpóreo) contendo 12% de proteína bruta por animal por dia, feno de *Coast cross* (*Cynodon dactylon*), sal mineral e água *ad libitum*. No dia anterior à indução da laminite, o ramo maxilar da

² Ivomec -

³ processo nº 019468-05 da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da FCAV/UNESP-Jaboticabal.

⁴ cânula - Khel® Cânulas Veterinárias Ltda, São Carlos - SP.

⁵ Techorse – Purina - Cargill Nutrição Animal Ltda – São Paulo - SP

artéria facial foi cateterizado segundo técnica previamente descrita (MARQUES et al., 1998) para monitoração direta da pressão arterial (P_A). Ao final do período experimental (48 horas), todos os animais foram sacrificados por meio da administração de EGG (120 mg/kg) seguida da infusão rápida de tiopental sódico⁶ (20mg/kg) e solução saturada de cloreto de potássio, todos por via intravenosa.

2.2.2. Delineamento Experimental

2.2.2.a. Grupos Experimentais

Todos os animais foram colocados em jejum sólido prévio de 12 horas, após esse período, água ou solução concentrada de CHO (solução de amido) foi administrada por meio de sonda nasogástrica. Decorridas oito horas da indução, os animais receberam solução salina ou tampão, administradas diretamente no ceco, através da cânula cecal.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais:

a) Grupo GCS (controle CHO, CHO+solução salina, n=6): nos animais deste grupo a laminite foi induzida por meio da administração de solução de CHO contendo 17,6 g de amido de milho⁷/kg de peso (MARTINS FILHO, 2002). O amido foi dissolvido em água na proporção de 1:1 e administrado por sonda nasogástrica. Decorridas oito horas da administração do amido, solução de cloreto de sódio a 0,9% (salina) foi administrada por via intracecal, em volume equivalente à metade do volume da solução de CHO.

b) Grupo GCT (grupo CHO-tampão, CHO + solução tampão, n=6): Os animais desse grupo receberam a mesma solução de CHO fornecida aos animais do grupo GCS e oito horas após a administração do amido, foi administrada, por via intracecal, uma solução tampão⁸ contendo hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$; 3,5 g), hidróxido de magnésio ($Mg(OH)_2$; 65,6 g) e dimeticona (1,2 g), diluídos em água e em volume equivalente à metade do volume da solução de CHO. O valor do pH da solução (9,26) foi aferido por meio de pHmetro⁹.

⁶ Tiopentax – Cristália, Campinas – SP.

⁷ Maizena – Refinações de Milho Brasil Ltda, Mogi Guaçu - SP.

⁸ Leite de Magnesia, GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro - RJ e Siludrox, Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo - SP.

⁹ Digimed DM-20.

c) *Grupo GAS (controle, água + solução salina, n=5)*: Aos animais deste grupo foi administrado água, por sonda nasogástrica, em volume equivalente àquele da solução de CHO usada para a indução da laminite e, oito horas depois, foi administrada solução salina por via intracecal em volume igual à metade de água.

d) *Grupo GAT (controle tampão, água + solução tampão, n=6)*: Os animais do grupo GAT receberam água, por sonda nasogástrica, em volume equivalente àquele da solução de CHO usada para a indução da laminite e, oito horas depois, receberam solução tampão igual à do grupo GCT e em volume igual à metade de água, por via intracecal.

2.2.2.b. Intervalos de Avaliação

Os parâmetros clínicos e laboratoriais foram avaliados imediatamente antes da administração da solução de CHO ou solução salina (T0) e 8, 12, 24 e 48 horas após (T8, T12, T24 e T48) (Fig 1).

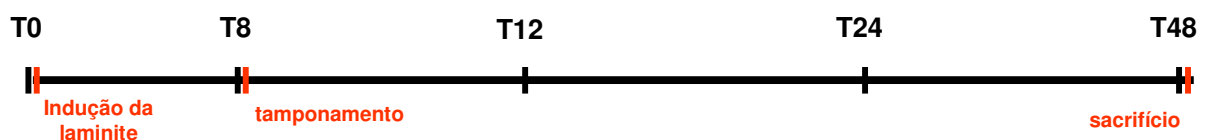


Figura 1 – Representação esquemática do período experimental com os respectivos intervalos de avaliação.

2.2.3. Procedimentos

2.2.3.a. Avaliações Clínicas

As variáveis clínicas avaliadas em cada tempo foram: temperatura retal (TR, °C) por meio de termômetro clínico comercial, frequência cardíaca (FC, batimentos/min) por meio de auscultação com estetoscópio, frequência respiratória (FR, respiração/min) por observação da movimentação do gradil costal durante a inspiração e expiração, pressão arterial (P_A, mmHg) por método invasivo, tempo de preenchimento capilar (TPC, seg) por compressão da mucosa oral da arcada superior determinando-se o

tempo em seg para o desaparecimento da impressão digital e motilidade cecal (MC, movimento/3 min) por meio de auscultação da fossa lombar direita com estetoscópio.

Também foram avaliadas a coloração das mucosas conjuntival e oral, consistência e coloração das fezes, pulso da artéria digital e temperatura do casco por sensação tátil, atitude e postura na baía.

As mucosas orais foram classificadas de acordo com sua coloração em: rósea pálida, rósea ictérica, ictérica hiperêmica, levemente hiperêmica, moderadamente hiperêmica e hiperêmica vermelho-tijolo com presença de halo toxêmico.

As fezes foram classificadas, de acordo com a consistência em: cíbalas arredondadas de consistência firme, pastosas e de consistência líquida (diarréia); e de acordo com sua coloração em verdes e esbranquiçadas.

A qualidade do pulso da artéria digital foi classificada de acordo com a pressão exercida sob os dedos indicador, médio e angular. A detecção do pulso sob um único dedo foi considerada como pulso fraco, sob dois dedos foi considerada como pulso normal, sob os três dedos foi considerada como pulso aumentado e a ausência de sensibilidade nos três dedos foi considerada como pulso imperceptível ou filiforme.

A avaliação da claudicação foi realizada baseando-se na classificação proposta por OBEL (1948) (Tab. 1, capítulo 1).

2.2.4.b. Avaliações Laboratoriais

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular, utilizando-se o sistema de colheita a vácuo¹⁰ com tubos contendo anticoagulante EDTA (etilenodiaminotetracético di-sódico) para realização de hemograma completo e proteínas totais (PT); fluoreto de sódio para dosagem de lactato e glicose; citrato de sódio para dosagem de fibrinogênio e tubos sem anticoagulante para determinação da atividade das enzimas AST (aspartato aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e CK (creatinoquinase).

As amostras do líquido peritoneal foram coletadas por meio de abdominocentese, com a utilização de cânula mamária estéril onde acoplou-se uma seringa de 20 ml para punção do líquido peritoneal e posterior transferência deste para

¹⁰ BD Vacutainer™. BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions, Plymouth, UK.

tubos a vácuo¹⁰ contendo solução anticoagulante EDTA para avaliação citológica, fluoreto de sódio para dosagem de lactato e glicose, citrato de sódio para dosagem de fibrinogênio. Amostras coletadas em tubos sem anticoagulante foram utilizadas para dosagem das enzimas AST, FA e CK e PT.

Para a contagem de hemácias, leucócitos e células nucleadas (líquido peritoneal) foi utilizado um diluidor¹¹ e em seguida um contador automático de células¹². Os esfregaços sangüíneos destinados às contagens diferenciais dos leucócitos e células nucleadas foram corados pela técnica de May-Grunwald-Giemsa. Determinada a contagem diferencial, os valores percentuais foram multiplicados pela contagem de leucócitos para a determinação das concentrações absolutas dos diversos leucócitos. O hematócrito (Ht) foi obtido pela técnica do microhematócrito. O teor de hemoglobina foi determinado por meio de “kit” comercial para hemoglobina¹³ e a leitura efetuada por meio de um sistema analisador semi-automático¹⁴.

Para a análise bioquímica, as amostras de soro, plasma e líquido peritoneal foram separadas após centrifugação (1.500 X g, 10 minutos), aliquotadas, congeladas e estocadas à temperatura de 20 °C negativos. O teor de PT foi determinado pelo método de Biureto¹⁵, a atividade da enzima AST pelo método de Reitman-Frankel¹⁶, da CK pelo método IFCC¹⁷ e a FA pelo método de Bowers-McCombs modificado¹⁸, e as concentrações de glicose pelo método de Bondar e Mead modificado¹⁹ utilizando-se conjunto de reagentes comerciais. A concentração de fibrinogênio²⁰ e os valores do lactato²¹ foram determinada utilizando-se “kit” comercial. As leituras das análises para obtenção dos resultados finais foram conduzidas em espectrofotômetro semi-automático com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste²². A densidade

¹¹ DA500 – CELM Cia Equip. Labort. Modernos, Barueri - SP.

¹² CC510 – CELM Cia Equip. Labort. Modernos, Barueri - SP.

¹³ Hemoglobina - LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa - MG.

¹⁴ Labquest® Bio 2000 - LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa - MG.

¹⁵ Ensaio Cinético em Ultravioleta - Biureto, LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa - MG.

¹⁶ AST/GOT Liquiform, ensaio cinético em ultravioleta – LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

¹⁷ CK-NAC Liquiform, ensaio cinético em ultravioleta – LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

¹⁸ Fosfatase Alcalina Liquiform, ensaio cinético colorimétrico – LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

¹⁹ Glicose HK Liquiform, ensaio cinético em ultravioleta–LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

²⁰ Fibrinogen - Sigma-Aldrich, St. Louis – MO - USA.

²¹ Lactato – LOD-PAP, método enzimático colorimétrico – Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda, Belo Horizonte, MG.

²² Labquest® Bio 2000 - LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG.

do líquido peritoneal foi medida por meio de refratometria²³ e o pH foi mensurado por meio de fitas indicadoras de pH²⁴.

As amostras do conteúdo cecal foram coletadas assepticamente por meio de bombeamento à vácuo através da cânula cecal, enquanto as amostras do conteúdo fecal foram coletadas diretamente da ampola retal, passadas em coador confeccionado em TNT²⁵ para obtenção do líquido fecal. O pH de ambas as amostras foi mensurado por meio de fitas indicadoras de pH²⁶ imediatamente após a colheita.

A dosagem de eletrólitos foi realizada a partir de amostras de sangue venoso colhidas em tubos estéreis contendo heparina sódica, centrifugadas a 1500 X g por minuto e o plasma sobrenadante foi coletado, aliquoteado e estocado em tubos de polipropileno em freezer – 70°C até serem analisadas. As concentrações de eletrólitos sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cálcio (Ca²⁺), magnésio (Mg²⁺) e cloro (Cl⁻) e o pH sangüíneo foram determinados por meio de analisador sangüíneo²⁷.

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada a partir de amostras de sangue e líquido peritoneal colhidas em tubos estéreis contendo heparina sódica, centrifugadas a 1500 X g por 10 minutos e o plasma sobrenadante foi coletado, aliquoteado e estocado em tubos de polipropileno em freezer - 70 °C até serem analisadas para a concentração de NO.

As concentrações de NO plasmático e do líquido peritoneal foram determinadas utilizando-se o método de quimioluminescência. Uma alíquota de cada animal foi descongelada em temperatura ambiente e em local escuro durante 20 a 30 minutos. O volume de 20 µL de cada amostras foi transferido para tubos de polipropileno e desproteinizadas pela adição de 80 µL de sulfato de zinco (ZnSO₄) e 100 µL de hidróxido de sódio (NaOH). A solução foi homogeneizada e deixada em descanso durante 10 minutos em ambiente escuro. Mais tarde, as amostras foram centrifugadas a 10000 X g durante 5 minutos e o sobrenadante foi removido para a análise. Em um tubo de polipropileno foi colocada uma pastilha de cádmio (Cd) e adicionou-se 0,2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de água

²³ Refratômetro modelo P2-NE - ATAGO.CO. LTD, Tóquio – Japão.

²⁴ pH Universal Indikator strips (0-14), Merck & Co., Inc, NJ - USA.

²⁵ Tecido não-tecido, 100% poliuretano não texturizado

²⁶ pH Universal Indikator strips (0-14), Merck & Co., Inc, NJ, USA

²⁷ Stat Profile® Critical care Xpress – CCX 12 Full Care Profile. Nova Biomedical, Waltham, MA – EUA.

deionizada (dH₂O), lavando as pastilhas e removendo o líquido. Adicionou-se então 0,2 mL de sulfato de cobre (CuSO₄) e inverteu-se o tubo gentilmente cerca de 10 vezes até as pastilhas adquirirem a coloração preta. Na seqüência, removeu-se o líquido e adicionou-se 1 mL de dH₂O agitando várias vezes para a lavagem completa das pastilhas. Finalmente, como preparação do redutor Cd-Cu, adicionou-se 0,2 mL de solução tampão removendo completamente a solução após a lavagem.

Em cada tubo contendo o redutor, adicionou-se 100 µL da amostra ou a solução padrão e 100 µL de solução tampão. Os tubos foram colocados em agitador automático por 25 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi retirado para realização imediata da medida do nitrito. A medida da concentração do NO foi realizada utilizando um sistema de detecção eletroquímica de NO²⁸.

As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP. As dosagens de eletrólitos e NO foram realizadas nas dependências do Department of Veterinary Clinical Sciences da School of Veterinary Medicine-Louisiana State University, Baton Rouge, LSU.

2.2.5. Análise Estatística

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e posteriormente, à análise de variância de duas vias seguida do teste Tukey para comparação de média (SAS - Statistical Analysis System)²⁹. Foi considerado um nível de significância de $p \leq 0,05$. Os parâmetros clínicos (atitude, temperatura do casco, pulso digital, coloração das membranas e consistência e coloração de fezes) foram apresentados de forma descritiva. Para o grau de OBEL, a freqüência dos escores foi analisada utilizando-se o método de Cochran-Mantel-Haenszel. As diferenças significativas na distribuição dos escores entre os grupos foram determinadas utilizando-se o método estatístico do teste do qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5%. O valor modal do escore (mais freqüente) foi utilizado como o resumo da medida para o grau de OBEL.

²⁸ ISO-NO mark II, isolated NO meter, Word Precision Instruments, Stevenage – UK.

²⁹ SAS for Windows versão 9.1, SAS Institute, Cary, NC, EUA.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Avaliação Clínica

Foram observados sinais de claudicação nos animais dos GCS e GCT. O período de aparecimento de sinais de claudicação entre esses grupos apresentou diferença ($p < 0,0001$), sendo que o tempo médio necessário para que 50% dos eqüinos demonstrassem grau 1 de OBEL no GCS e GCT foi 12 e 24 horas após a administração do CHO, respectivamente (Tab. 2). O aumento da temperatura da muralha do casco foi coincidente ao aumento do grau de OBEL nesses grupos. As variações dos graus de OBEL para cada grupo ao longo do período experimental estão representadas na Fig.2.

Os animais que demonstraram sinais de claudicação, tanto no GCS quanto no GCT, apresentaram sinais evidentes de dor moderada (67% e 33% respectivamente) a severa (17% e 33%, respectivamente) a partir de T24, deitando na baia a partir de T24 (33% em ambos os grupos), e em alguns casos relutando se levantar (17% em ambos os grupos).

Os eqüinos expostos à sobrecarga de CHO apresentaram alterações na qualidade do pulso das artérias digitais dos membros torácicos, sendo que este estava aumentado em 50 % dos animais do GCS a partir de 12 horas e em 67% dos animais do GCT 24 horas após a indução da laminite. Essas alterações perduraram até o final do período experimental. Não foram notadas quaisquer alterações na qualidade do pulso das artérias digitais dos membros torácicos dos GAS e GAT.

Oitenta e três por cento dos animais do GCT apresentaram fezes de consistência pastosa e coloração verde-esbranquiçada entre oito e 12 horas e, após esse período, 50% dos animais apresentaram diarreia acompanhada de depressão e desconforto abdominal, sendo que ao final de 48 horas de observação esse índice alcançou 60%. No GCS, 33% dos animais apresentaram fezes de consistência pastosa e coloração verde-esbranquiçada entre 12 e 24 horas, sendo que 66% apresentaram diarreia com depressão e desconforto abdominal após 24 horas. A consistência e o aspecto das fezes dos animais dos grupos GAS e GAT não se alteraram no decorrer do experimento, bem como não foram observados sinais de depressão ou desconforto abdominal.

A motilidade cecal dos animais dos GAS e GAT apresentou-se normal durante todo o período experimental. Foi observado no GCT, 24 horas após a administração do CHO, aumento da motilidade cecal quando comparado ao valor basal ($p=0,0008$). Os grupos que receberam CHO apresentaram aumento da motilidade em T48 ($p=0,01$; $p=0,0023$), também comparado ao valor basal (Tab. e Fig. 3).

A congestão das mucosas orais nos animais dos GCT foi evidente a partir de 12 horas após a indução, quando 50% dos animais apresentaram coloração moderadamente hiperêmica. No T48, intensa coloração vermelho-tijolo com halo toxêmico já era evidente em 50% dos animais com concomitante aumento do TPC (Tab. e Fig. 4). No GCS, 60% dos animais apresentaram coloração moderadamente hiperêmica a partir de T24 e 40% dos animais apresentaram halo toxêmico gengival 48 horas após a indução. A coloração da mucosa oral do GAS e GAT apresentou-se rósea em todos os momentos de avaliação.

Elevações da FC foram evidentes no GCS e GCT às 48 horas após a indução quando comparada com T0 ($p<0,0001$ e $p=0,0024$, respectivamente). Não foram observadas, ao longo do período experimental, alterações na FC dos equinos dos grupos GAS e GAT (Tab. e Fig. 5).

Os valores da temperatura retal registrados para todos os grupos apresentaram alterações entre T8 e T12 ($p<0,0001$). Em GAS e GAT retornaram aos valores basais. Em GCS e GCT mantiveram-se elevadas até T48 ($p<0,0001$) (Tab. e Fig. 6).

Não foram observadas alterações na frequência respiratória e pressão arterial média em nenhum dos grupos estudados.

Entre o período de 24 e 36 horas um animal do GCS e outro do GCT vieram a óbito. Eles apresentavam atonia intestinal, distensão abdominal, mucosa oral hiperêmica e cianose. As extremidades dos membros torácicos estavam frias ao toque. Entretanto, todos os dados registrados até T24 destes animais foram incluídos nos resultados.

Tabela 2 – Freqüência (%) dos escores de grau de claudicação segundo OBEL em eqüinos com laminite induzida por sobrecarga de CHO tratados com solução salina (GCS) ou solução tampão.

| Escore | Grupo | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | | |
|--------|-------|-------|-------------------------------------|----|----|----|----|
| | | | 0 | 8 | 12 | 24 | 48 |
| 0 | GCS | 100 | 67 | 17 | 0 | 0 | |
| | GCT | 100 | 83 | 67 | 0 | 0 | |
| 1 | GCS | 0 | 33 | 50 | 17 | 0 | |
| | GCT | 0 | 17 | 17 | 50 | 0 | |
| 2 | GCS | 0 | 0 | 33 | 67 | 80 | |
| | GCT | 0 | 0 | 17 | 33 | 60 | |
| 3 | GCS | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | GCT | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | |
| 4 | GCS | 0 | 0 | 0 | 17 | 20 | |
| | GCT | 0 | 0 | 0 | 17 | 20 | |

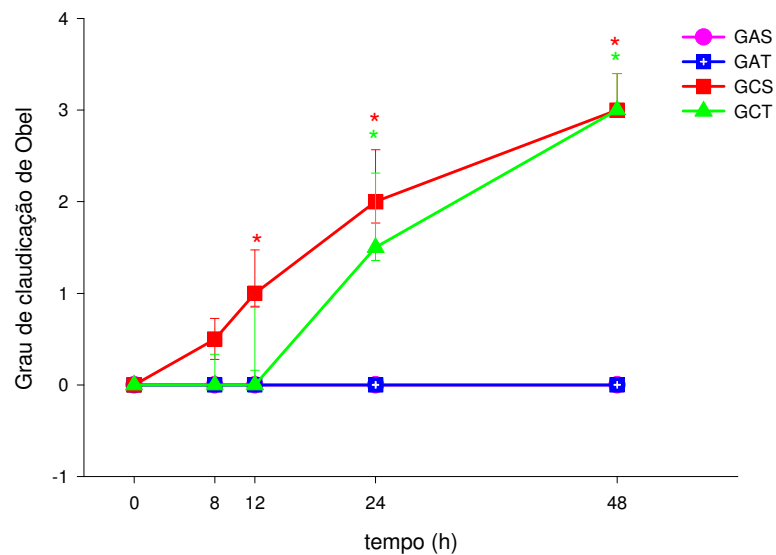


Figura 2 – Representação gráfica da mediana \pm DP do grau de claudicação segundo OBEL, ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO em eqüinos tratados com solução tampão ou solução salina. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 3 – Média e desvio padrão da motilidade cecal (movimentos/3 minutos) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 1,2 ^a [0,8] | 1,2 ^a [0,8] | 1,4 ^a [0,5] | 1,0 ^a [0,7] | 0,8 ^a [0,8] |
| GCS | 1,3 ^a [0,5] | 1,6 ^a [0,9] | 1,0 ^a [1,1] | 1,0 ^a [1,1] | 2,2 ^{b*} [0,4] |
| GCT | 1,8 ^a [0,4] | 1,8 ^a [0,4] | 1,3 ^a [1,0] | 1,8 ^{b*} [1,2] | 2,2 ^{b*} [0,8] |
| GAT | 1,5 ^a [0,5] | 1,3 ^a [0,5] | 0,8 ^a [0,8] | 1,0 ^a [0,6] | 1,0 ^a [1,0] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

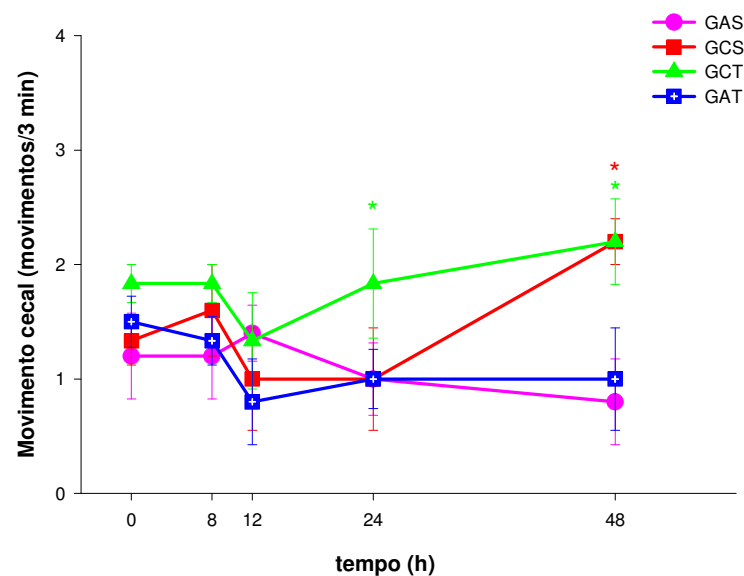


Figura 3 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) da motilidade cecal em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 4 – Média e desvio padrão do tempo de preenchimento capilar (seg) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 2,0 ^a [0,0] | 2,0 ^a [0,0] | 2,0 ^a [0,0] | 2,0 ^a [0,0] | 2,0 ^a [0,0] |
| GCS | 2,0 ^a [0,0] | 2,3 ^a [0,5] | 2,5 ^{b*} [0,5] | 2,5 ^{b*} [0,5] | 2,6 ^{b*} [0,5] |
| GCT | 2,0 ^a [0,0] | 2,3 ^a [0,8] | 2,6 ^{b*} [0,8] | 2,6 ^{b*} [0,8] | 2,8 ^{b*} [0,8] |
| GAT | 2,0 ^a [0,0] | 2,0 ^a [0,0] | 2,0 ^a [0,0] | 2,0 ^a [0,0] | 2,1 ^a [0,4] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

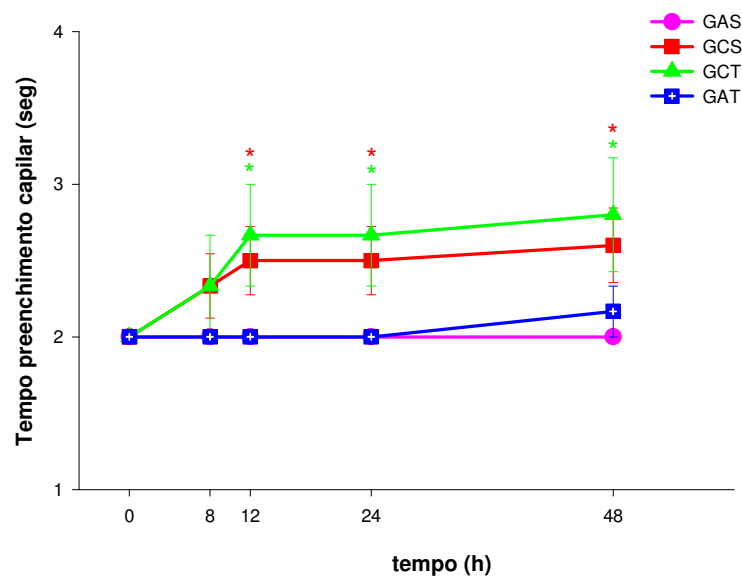


Figura 4 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) do tempo de preenchimento capilar em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 5 – Média e desvio padrão da frequência cardíaca (batimentos/min) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 36 ^a [12] | 39 ^a [10] | 39 ^a [10] | 35 ^a [7] | 41 ^a [5] |
| GCS | 31 ^a [2] | 43 ^a [10] | 37 ^a [6] | 43 ^a [8] | 52 ^{a*} [38] |
| GCT | 37 ^a [7] | 42 ^a [5] | 40 ^a [4] | 43 ^a [12] | 71 ^{b*} [31] |
| GAT | 32 ^a [5] | 41 ^a [7] | 32 ^a [9] | 34 ^a [6] | 31 ^a [8] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

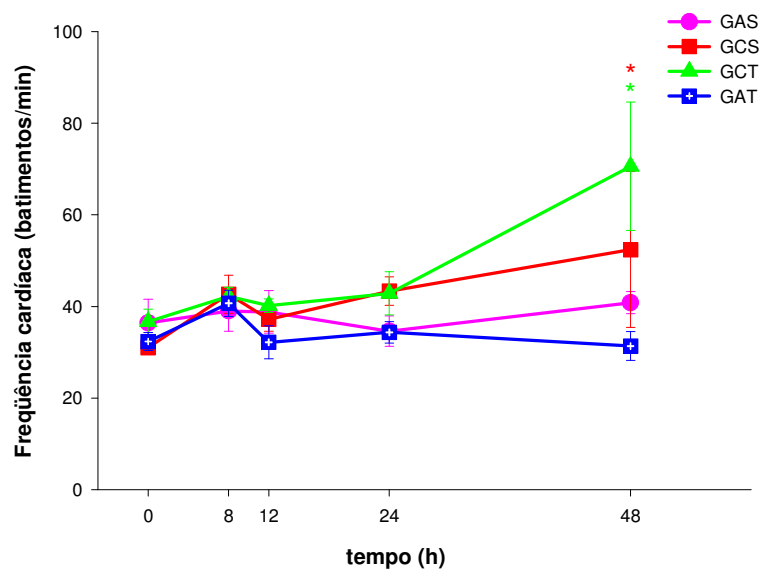


Figura 5 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) da frequência cardíaca em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 6 – Média e desvio padrão da temperatura retal (°C) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 37,2 ^a [0,4] | 38,0 ^{a*} [0,2] | 38,3 ^{a*} [0,4] | 37,6 ^a [0,5] | 37,4 ^a [0,5] |
| GCS | 37,5 ^a [0,3] | 38,5 ^{a*} [0,3] | 38,3 ^{a*} [0,2] | 38,0 ^{ab*} [0,3] | 38,8 ^{b*} [0,6] |
| GCT | 37,2 ^a [0,5] | 38,4 ^{a*} [0,4] | 38,2 ^{a*} [0,4] | 38,4 ^{b*} [0,4] | 38,9 ^{b*} [1,2] |
| GAT | 37,0 ^a [0,4] | 38,2 ^{a*} [0,2] | 38,0 ^{a*} [0,5] | 37,4 ^a [0,3] | 37,6 ^{a*} [0,3] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

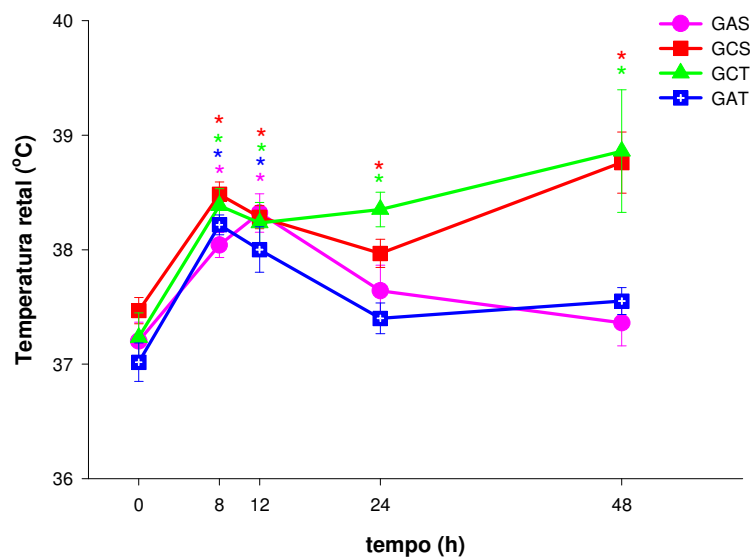


Figura 6 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) da temperatura retal em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

2.3.2. Análise Hematológica e Bioquímica

Foi observado aumento na contagem total de leucócitos nos grupos GCS, GCT e GAT em T8. Esses valores continuaram aumentados em GCS e GCT até o final do período experimental ($p < 0,0001$). Em GAT esses valores tenderam a retornar aos valores basais (Tab. e Fig. 7). Na contagem diferencial de leucócitos observou-se que essa elevação deveu-se, principalmente, ao aumento no número de neutrófilos segmentados ($p < 0,0001$, Tab. e Fig. 8). Os valores médios absolutos de neutrófilos bastonetes, eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos não apresentaram diferenças significativas no decorrer do experimento.

No GCS e GCT observou-se aumento no número de eritrócitos e no valor do Ht entre 24 e 48 horas após O CHO ($p = 0,0347$; $p = 0,0287$). No GCT houve aumento no teor de Hb enquanto no GCS os valores permaneceram dentro dos valores basais durante todo o período experimental ($p = 0,0444$) (Tab. e Fig. 9, 10 e 11).

Não foram observadas alterações entre os grupos nos eletrólitos sangüíneos. Apesar disso, notou-se aumento nas concentrações de Cl^- no GCT entre T8 e T24 e no GCS entre T12 e T24 ($p = 0,0433$; Tab. e Fig. 12). Foi observado também aumento nas concentrações de Mg^{++} em GAT entre T12 e T48 ($p = 0,0213$; Tab. e Fig. 13). As médias dos valores do pH venoso diminuíram em GCS e GCT logo após a indução da laminite até T48 ($p < 0,0001$; Tab. e Fig. 14).

Não se observaram quaisquer alterações na concentração plasmática de fibrinogênio, proteínas totais, AST, CK e FA no decorrer do experimento. Foi observado aumento nos valores do lactato a partir de 8 h em GCS ($p = 0,0281$) e a partir de 12 h em GCT ($p = 0,0420$), mantendo-se elevados em ambos os grupos até T48 (Tab. e Fig. 15).

Os valores da concentração de NO sérico não apresentaram alterações.

Tabela 7 – Média e desvio padrão de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 8,3 ^a [2,1] | 9,4 ^a [1,8] | 9,1 ^a [1,5] | 8,3 ^a [1,8] | 8,4 ^a [2,3] |
| GCS | 9,5 ^a [1,2] | 13,4 ^{b*} [1,7] | 11,4 ^{a*} [2,4] | 11,4 ^{a*} [1,5] | 14,0 ^{b*} [2,0] |
| GCT | 8,3 ^a [3,2] | 10,9 ^{b*} [4,3] | 9,8 ^a [4,5] | 11,0 ^{a*} [3,6] | 12,8 ^{b*} [4,6] |
| GAT | 8,4 ^a [1,8] | 8,9 ^a [1,8] | 9,9 ^a [1,9] | 8,9 ^a [1,9] | 9,3 ^a [1,7] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

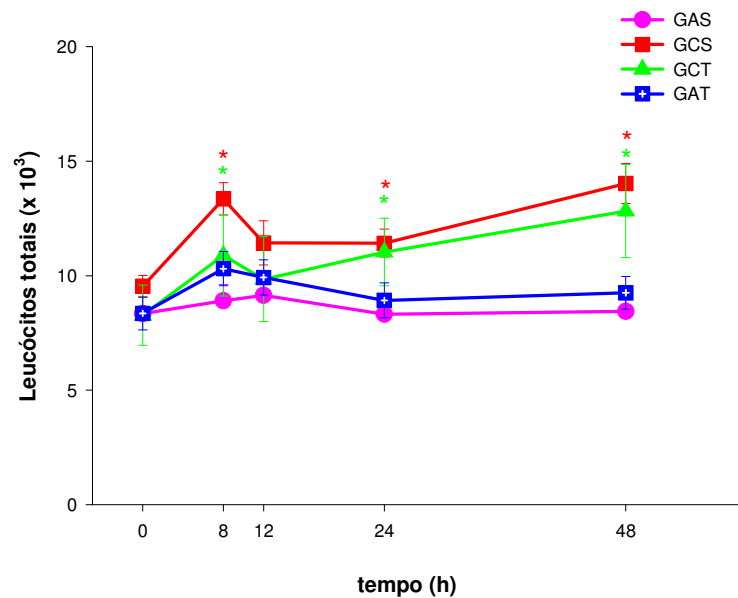


Figura 7 – Representação gráfica dos valores médios ($\pm\text{DP}$) de leucócitos no sangue de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 8 – Média e desvio padrão de neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 4,8 ^a [1,5] | 5,5 ^a [1,8] | 5,4 ^a [1,4] | 4,7 ^a [1,1] | 4,7 ^a [1,9] |
| GCS | 5,8 ^a [1,3] | 7,8 ^{a*} [4,3] | 8,0 ^{a*} [2,7] | 8,8 ^{bc*} [1,9] | 11,0 ^{b*} [2,5] |
| GCT | 4,9 ^a [2,2] | 6,3 ^{a*} [4,2] | 7,5 ^{a*} [3,6] | 9,2 ^{b*} [4,2] | 10,7 ^b [4,7] |
| GAT | 4,4 ^a [1,2] | 6,1 ^a [1,6] | 6,3 ^{a*} [2,1] | 5,4 ^{ac} [1,4] | 4,9 ^{a*} [1,7] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

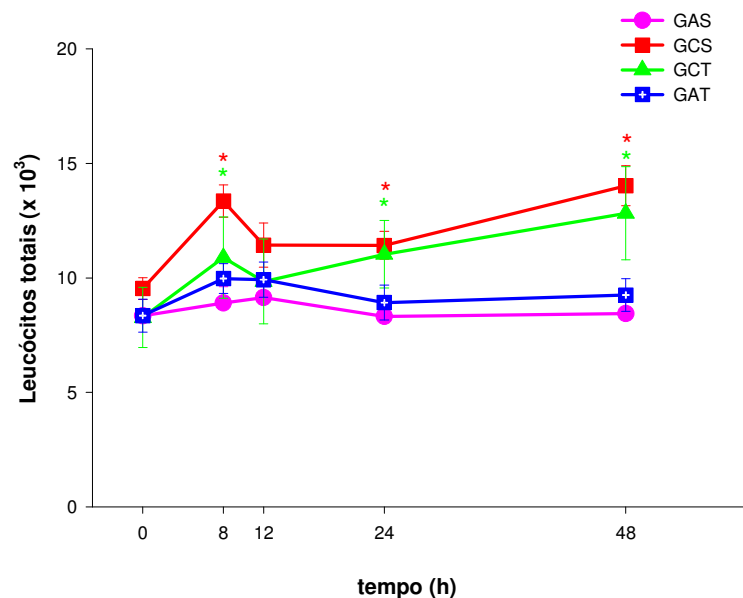


Figura 8 – Representação gráfica dos valores médios ($\pm\text{DP}$) de neutrófilos segmentados no sangue de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 9 – Média e desvio padrão de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 5,9 ^a [0,3] | 6,0 ^a [0,6] | 6,0 ^{ab} [0,4] | 5,8 ^a [0,7] | 6,0 ^a [0,5] |
| GCS | 6,7 ^a [0,3] | 6,7 ^a [0,4] | 6,8 ^a [0,5] | 6,5 ^a [0,3] | 7,9 ^{b*} [1,5] |
| GCT | 6,1 ^a [0,7] | 6,0 ^a [0,8] | 6,3 ^a [1,2] | 6,0 ^a [1,2] | 7,4 ^{b*} [1,0] |
| GAT | 6,1 ^a [0,7] | 6,2 ^a [0,4] | 6,5 ^a [0,6] | 6,3 ^a [0,9] | 6,1 ^a [0,6] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

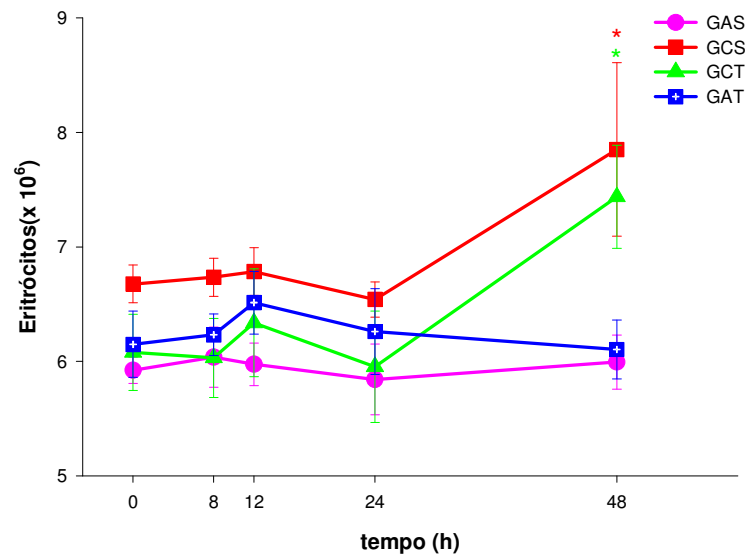


Figura 9 – Representação gráfica dos valores médios ($\pm\text{DP}$) de eritrócitos em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 10 – Média e desvio padrão dos teores de hemoglobina (g/dL) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 9,3 ^a [0,8] | 9,2 ^a [1,0] | 8,8 ^a [0,8] | 8,8 ^a [0,8] | 9,2 ^a [1,5] |
| GCS | 10,6 ^a [1,1] | 10,5 ^a [0,9] | 11,0 ^b [1,3] | 10,6 ^b [1,2] | 11,0 ^{bc} [2,3] |
| GCT | 9,6 ^a [1,6] | 10,3 ^a [1,3] | 10,2 ^{ab} [1,9] | 10,3 ^{ab} [1,7] | 12,3 ^{b*} [1,3] |
| GAT | 9,3 ^a [1,7] | 9,8 ^a [1,2] | 10,0 ^{ab} [1,7] | 9,8 ^{ab} [1,6] | 9,6 ^{ac} [1,3] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

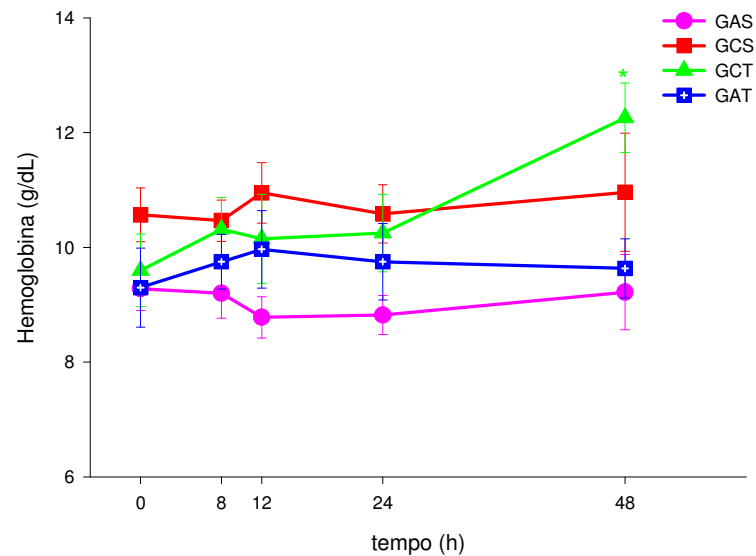


Figura 10 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) dos teores de hemoglobina em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 11 – Média e desvio padrão do hematócrito (%) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 28 ^a [2] | 28 ^a [1] | 27 ^a [1] | 27 ^a [1] | 28 ^a [2] |
| GCS | 30 ^a [2] | 32 ^a [4] | 33 ^b [4] | 32 ^b [3] | 35 ^{bc*} [9] |
| GCT | 29 ^a [5] | 31 ^a [3] | 32 ^{ab} [4] | 31 ^{ab} [6] | 36 ^{bc*} [5] |
| GAT | 29 ^a [2] | 30 ^a [4] | 31 ^{ab} [4] | 31 ^{ab} [4] | 31 ^{ac} [4] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

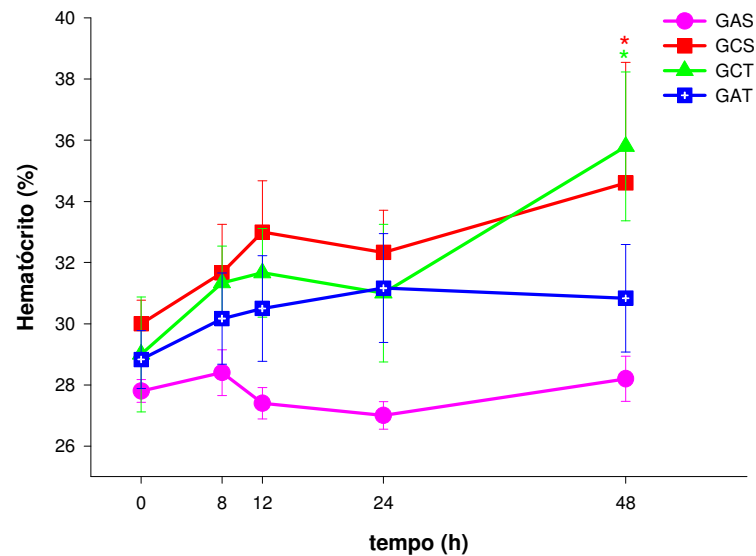


Figura 11 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) do hematócrito em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 12 – Média e desvio padrão do cloro (mmol/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 105,2 ^a [2,2] | 105,0 ^a [3,2] | 106,3 ^a [2,8] | 106,9 ^a [2,0] | 107,8 ^a [1,7] |
| GCS | 103,9 ^a [5,6] | 106,6 ^{a*} [1,9] | 108,8 ^{a*} [3,6] | 107,1 ^{a*} [5,3] | 105,5 ^a [4,8] |
| GCT | 103,2 ^a [2,9] | 107,3 ^{a*} [3,8] | 109,6 ^a [4,6] | 109,6 ^a [3,4] | 102,8 ^a [4,5] |
| GAT | 104,3 ^a [3,9] | 104,3 ^a [3,5] | 106,2 ^{a*} [2,6] | 106,4 ^{a*} [1,9] | 106,5 ^a [2,0] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

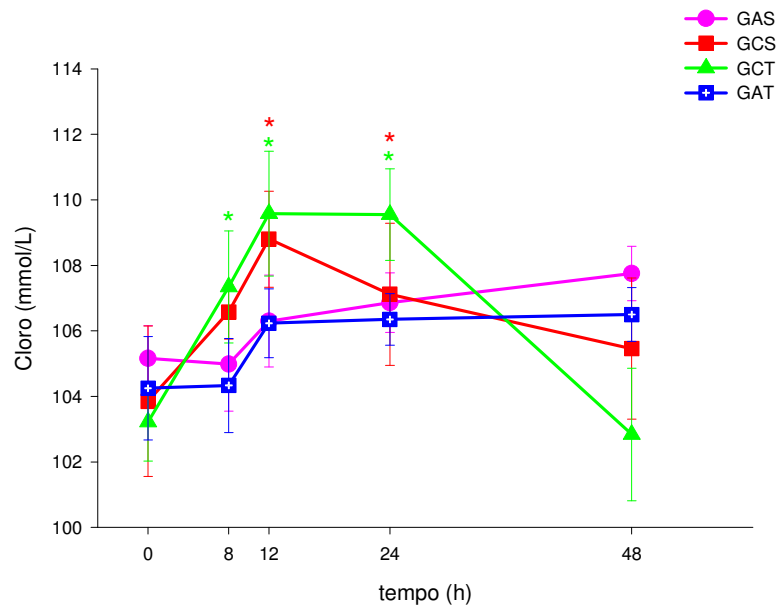


Figura 12 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) do cloro em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 13 – Média e desvio padrão do magnésio (mmol/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,54 ^a [0,06] | 0,56 ^a [0,05] | 0,57 ^a [0,06] | 0,56 ^a [0,03] | 0,58 ^a [0,05] |
| GCS | 0,54 ^a [0,07] | 0,58 ^a [0,07] | 0,57 ^a [0,07] | 0,57 ^a [0,08] | 0,56 ^a [0,07] |
| GCT | 0,53 ^a [0,07] | 0,54 ^a [0,04] | 0,56 ^{a*} [0,05] | 0,54 ^{a*} [0,04] | 0,52 ^{a*} [0,08] |
| GAT | 0,51 ^a [0,03] | 0,54 ^{a*} [0,03] | 0,62 ^a [0,06] | 0,60 ^a [0,05] | 0,59 ^a [0,02] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

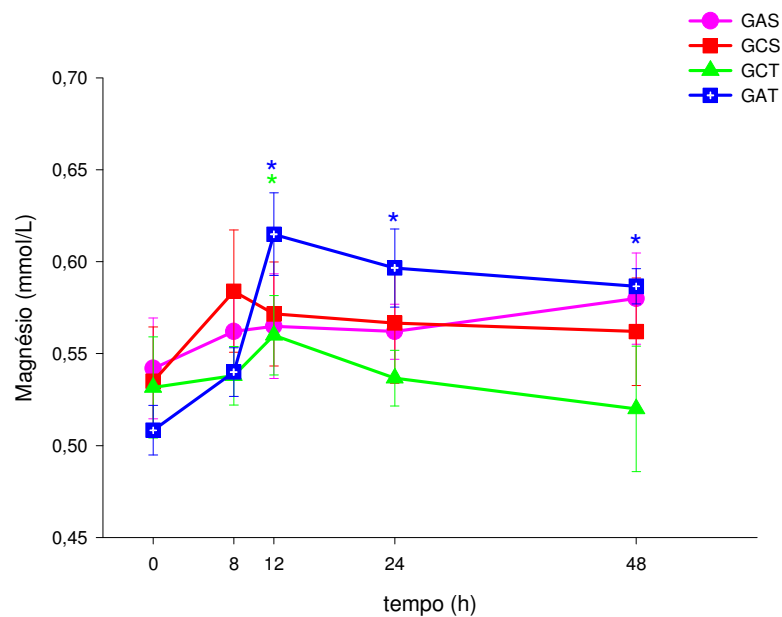


Figura 13 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) do magnésio em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 14 – Média e desvio padrão do pH venoso em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 7,47 ^a [0,08] | 7,49 ^a [0,05] | 7,47 ^{ab} [0,10] | 7,46 ^a [0,02] | 7,45 ^{ab} [0,06] |
| GCS | 7,44 ^a [0,04] | 7,34 ^{b*} [0,04] | 7,39 ^{b*} [0,12] | 7,33 ^{b*} [0,15] | 7,31 ^{bc*} [0,18] |
| GCT | 7,43 ^a [0,06] | 7,38 ^a [0,07] | 7,37 ^a [0,12] | 7,28 ^{a*} [0,08] | 7,36 ^a [0,07] |
| GAT | 7,46 ^a [0,09] | 7,53 ^{b*} [0,03] | 7,50 ^b [0,05] | 7,51 ^{b*} [0,07] | 7,47 ^{c*} [0,06] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).
* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

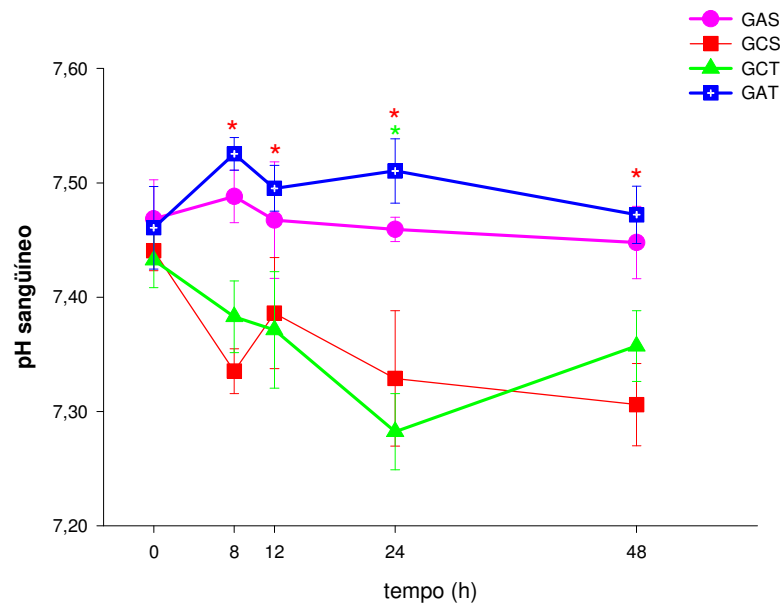


Figura 14 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) do pH venoso em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 15 – Média e desvio padrão de lactato sanguíneo (mg/dL) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 7,0 ^a [1,1] | 7,3 ^a [1,2] | 8,2 ^a [1,1] | 8,2 ^a [1,7] | 8,0 ^a [3,3] |
| GCS | 11,2 ^a [6,1] | 15,6 ^{b*} [5,3] | 15,0 ^a [5,2] | 18,9 ^{ab*} [12,8] | 12,6 ^{ab*} [8,2] |
| GCT | 8,6 ^a [5,3] | 12,6 ^{ab} [4,3] | 15,1 ^{a*} [5,7] | 19,5 ^{b*} [12,4] | 18,7 ^{b*} [8,3] |
| GAT | 7,6 ^a [1,7] | 9,0 ^{ab} [5,8] | 8,4 ^a [3,1] | 10,1 ^a [5,3] | 10,4 ^a [5,4] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

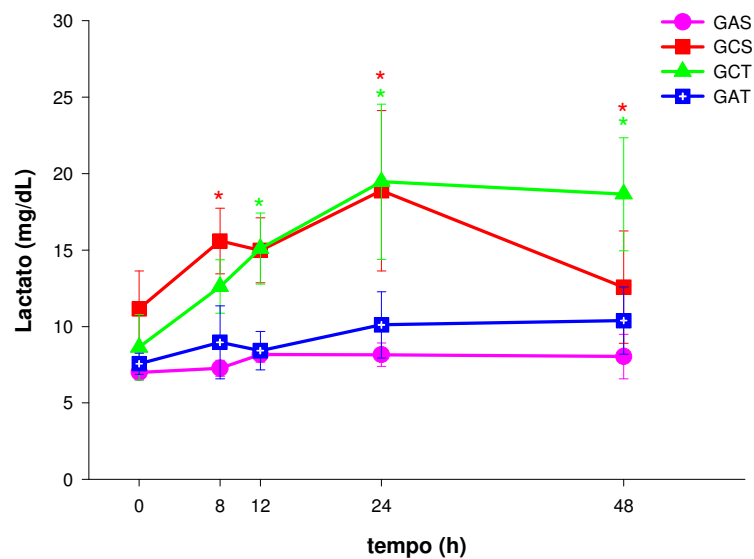


Figura 15 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) do lactato sanguíneo em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

2.3.3. Análise do Líquido Peritoneal

Foi observado aumento na contagem de células nucleadas totais entre 12 e 48 horas após a sobrecarga de CHO nos grupos GCS e GCT ($p=0,0019$; Tab. e Fig. 16). Esse aumento ocorreu, principalmente, por aumento de neutrófilos segmentados (Tab. e Fig. 17) e de células mononucleadas (Tab. e Fig. 18). Os valores absolutos de eosinófilos, neutrófilos bastonetes e linfócitos e da contagem de eritrócitos não se alteraram no decorrer do experimento.

Nas análises bioquímicas do líquido peritoneal ocorreram alterações na atividade da FA entre T12 e T48 nos grupos GCS e GCT ($p=0,0121$, Tab. e Fig. 19). Houve aumento nas concentrações de lactato a partir de 24 horas em GCT ($p=0.0134$) e às 48 horas em GCS ($p=0,0192$) (Tab. e Fig. 20).

A concentração de glicose no líquido peritoneal mostrou-se elevada nos eqüinos do GCS e GCT em T48 ($p=0,0001$; Tab. e Fig. 21). Não se observou quaisquer alterações na atividade sérica da CK e da AST ou nas concentrações de fibrinogênio e de PT no decorrer do experimento, bem como nos valores do pH e densidade do líquido peritoneal.

Os valores da concentração de óxido nítrico do líquido peritoneal não apresentaram alterações.

Tabela 16 – Média e desvio padrão de células nucleadas peritoneais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 4,2 ^a [3,5] | 5,9 ^a [6,0] | 5,1 ^a [4,8] | 4,8 ^a [4,3] | 3,6 ^a [2,7] |
| GCS | 3,3 ^a [3,2] | 2,9 ^a [2,9] | 4,4 ^a [4,6] | 43,8 ^{b*} [41,1] | 61,0 ^{b*} [43,0] |
| GCT | 1,5 ^a [0,8] | 1,6 ^a [0,4] | 3,0 ^a [1,8] | 28,8 ^{b*} [24,3] | 37,3 ^{c*} [19,2] |
| GAT | 3,8 ^a [3,6] | 3,7 ^a [2,9] | 4,3 ^a [3,7] | 6,2 ^a [7,5] | 5,1 ^a [4,1] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

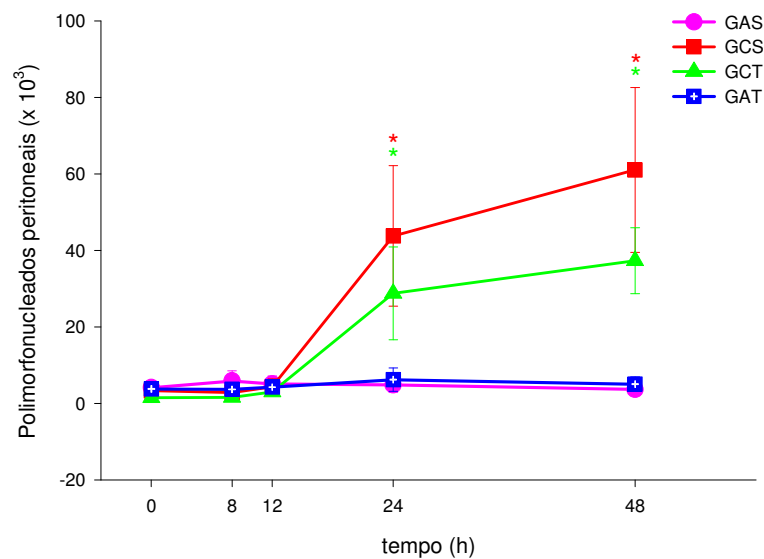


Figura 16 – Representação gráfica dos valores médios ($\pm\text{DP}$) das células nucleadas peritoneais em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 17 – Média e desvio padrão de neutrófilos segmentados peritoneais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 1,6 ^a [1,1] | 3,8 ^a [4,5] | 3,2 ^a [3,7] | 2,8 ^{ac} [2,7] | 2,0 ^a [1,8] |
| GCS | 1,6 ^a [2,4] | 1,7 ^a [2,2] | 2,1 ^a [3,3] | 32,5 ^{b*} [39,6] | 42,3 ^{b*} [35,0] |
| GCT | 1,2 ^a [0,9] | 0,9 ^a [0,1] | 2,2 ^a [2,2] | 15,1 ^{c*} [11,8] | 31,4 ^{b*} [21,0] |
| GAT | 1,7 ^a [1,4] | 1,6 ^a [1,1] | 2,0 ^a [1,4] | 3,9 ^{ac} [5,5] | 3,2 ^a [3,0] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

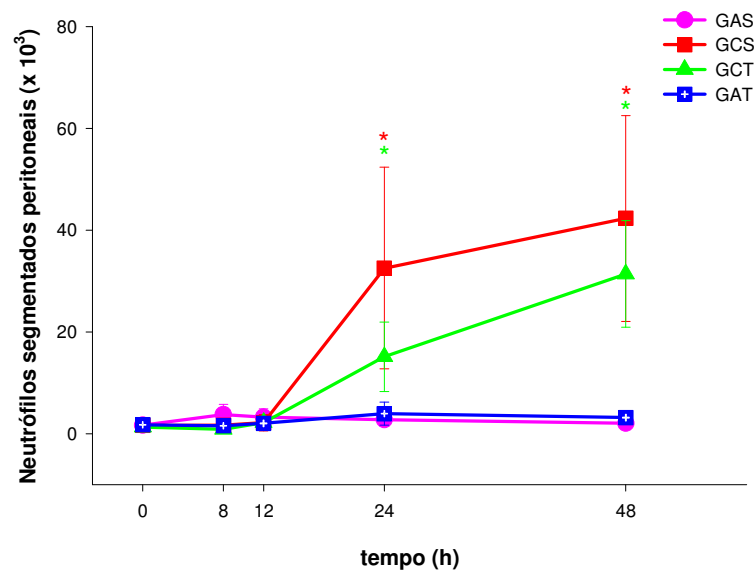


Figura 17 – Representação gráfica dos valores médios ($\pm\text{DP}$) dos neutrófilos segmentados peritoneais em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 18 – Média e desvio padrão de células mononucleadas peritoneais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 2,1 ^a [2,3] | 1,5 ^a [1,2] | 1,4 ^a [1,1] | 1,7 ^a [1,5] | 1,2 ^a [0,9] |
| GCS | 0,8 ^a [0,9] | 0,8 ^a [0,8] | 0,2 ^a [0,2] | 1,8 ^a [1,8] | 2,7 ^{ab*} [3,2] |
| GCT | 0,7 ^a [0,7] | 0,5 ^a [0,2] | 0,4 ^a [0,3] | 3,0 ^{a*} [2,9] | 3,5 ^{b*} [1,1] |
| GAT | 1,7 ^a [2,4] | 1,8 ^a [1,9] | 1,7 ^a [2,1] | 1,9 ^a [1,9] | 1,4 ^a [1,0] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

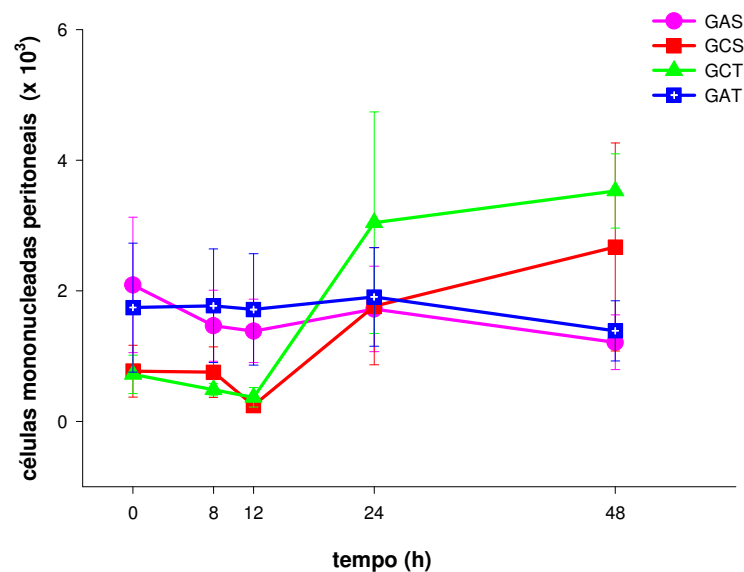


Figura 18 – Representação gráfica dos valores médios ($\pm\text{DP}$) das células mononucleadas peritoneais em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 19 – Média e desvio padrão da enzima FA peritoneal (U/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 56,3 ^a [18,0] | 69,6 ^a [27,3] | 79,6 ^a [53,9] | 71,3 ^a [41,3] | 64,6 ^{ac} [30,7] |
| GCS | 43,0 ^a [10,8] | 41,4 ^a [19,5] | 117,7 ^a [139,0] | 575,6 ^{b*} [554,4] | 358,6 ^{b*} [386,1] |
| GCT | 38,6 ^a [10,1] | 35,8 ^a [8,7] | 60,8 ^a [28,1] | 323,9 ^{c*} [272,8] | 255,4 ^{bc*} [213,1] |
| GAT | 60,8 ^a [64,0] | 50,9 ^a [36,9] | 48,3 ^a [23,2] | 49,7 ^a [29,7] | 49,7 ^a [24,2] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

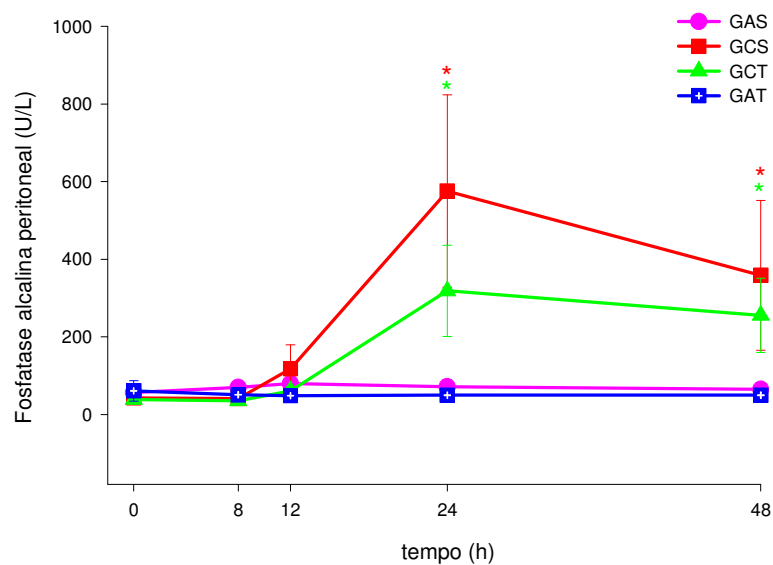


Figura 19 – Representação gráfica das variações da FA peritoneal em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 20 – Média e desvio padrão do lactato peritoneal (mg/dL) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 7,0 ^a [1,9] | 6,9 ^a [1,4] | 7,0 ^{ab} [1,8] | 7,8 ^a [1,3] | 9,3 ^a [3,1] |
| GCS | 9,0 ^a [6,3] | 12,3 ^a [5,0] | 15,0 ^{ab} [5,6] | 13,3 ^{ab} [6,9] | 21,0 ^{ab*} [24,5] |
| GCT | 11,3 ^a [8,3] | 13,8 ^a [2,4] | 17,5 ^b [6,5] | 25,5 ^{b*} [18,7] | 26,0 ^{b*} [14,8] |
| GAT | 8,1 ^a [1,7] | 8,9 ^a [5,7] | 6,8 ^a [2,0] | 8,7 ^a [6,0] | 11,2 ^a [5,9] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

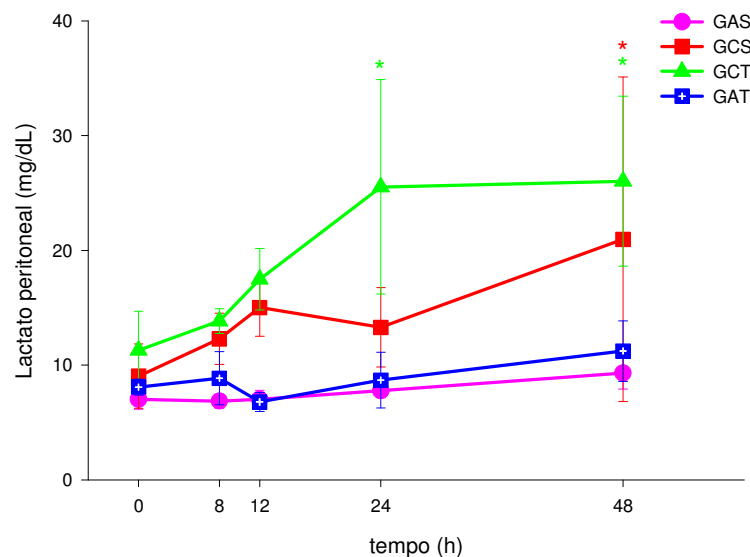


Figura 20 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) do lactato peritoneal em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 21 – Média e desvio padrão da glicose peritoneal (mg/dL) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 83,1 ^a [7,4] | 88,9 ^a [8,6] | 92,6 ^a [9,8] | 77,9 ^a [16,6] | 87,0 ^a [5,2] |
| GCS | 73,9 ^a [12,9] | 82,6 ^a [19,6] | 77,2 ^a [17,2] | 98,6 ^a [7,4] | 123,4 ^{b*} [45,9] |
| GCT | 76,1 ^a [9,6] | 93,6 ^{b*} [12,2] | 84,5 ^a [15,1] | 80,3 ^a [27,9] | 117,0 ^{b*} [22,6] |
| GAT | 84,4 ^a [6,3] | 87,0 ^a [7,4] | 96,6 ^a [7,9] | 102,0 ^a [5,5] | 103,9 ^{ab} [20,4] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

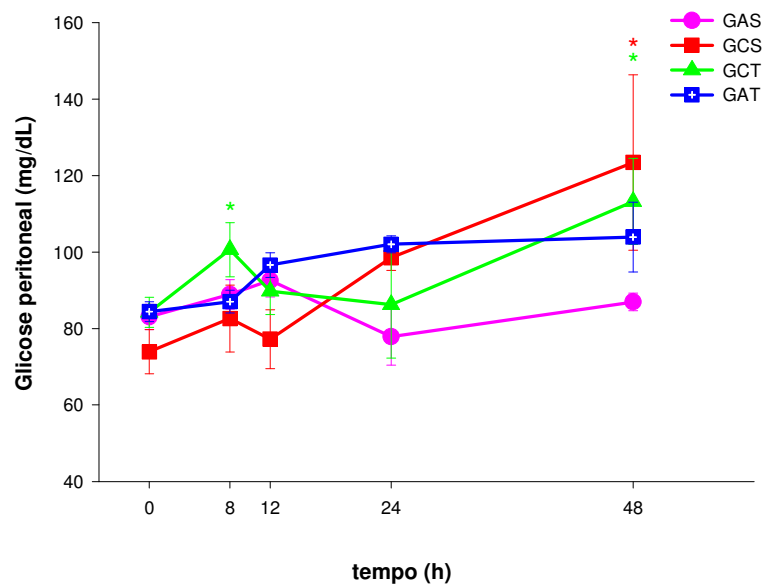


Figura 21 – Representação gráfica dos valores médios (\pm DP) da glicose peritoneal em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

2.3.4. Análise do Conteúdo Cecal

Foi observado redução nos valores do pH cecal a partir de 8 horas da administração da sobrecarga de CHO nos grupos GCS e GCT ($p < 0,0001$; Tab. e Fig. 22). No entanto, no GCT notou-se que após 24 horas da administração do CHO esses valores retornaram aos valores basais, enquanto no GCS permaneceu reduzido até o final do período experimental. Quando os grupos com laminite induzida foram comparados entre si, pode-se observar que a redução do pH foi mais pronunciada no GCS que no GCT ($p < 0,0001$).

Tabela 22 – Média e desvio padrão do pH cecal em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 8 ^a [1] | 8 ^a [1] | 8 ^a [1] | 8 ^a [1] | 8 ^{abc} [1] |
| GCS | 9 ^a [1] | 5 ^{b*} [1] | 6 ^{b*} [1] | 6 ^{b*} [1] | 7 ^{b*} [1] |
| GCT | 9 ^a [0] | 6 ^{c*} [1] | 7 ^{c*} [1] | 7 ^{c*} [2] | 8 ^c [1] |
| GAT | 9 ^a [1] | 6 ^a [1] | 7 ^a [1] | 7 ^a [2] | 8 ^a [1] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

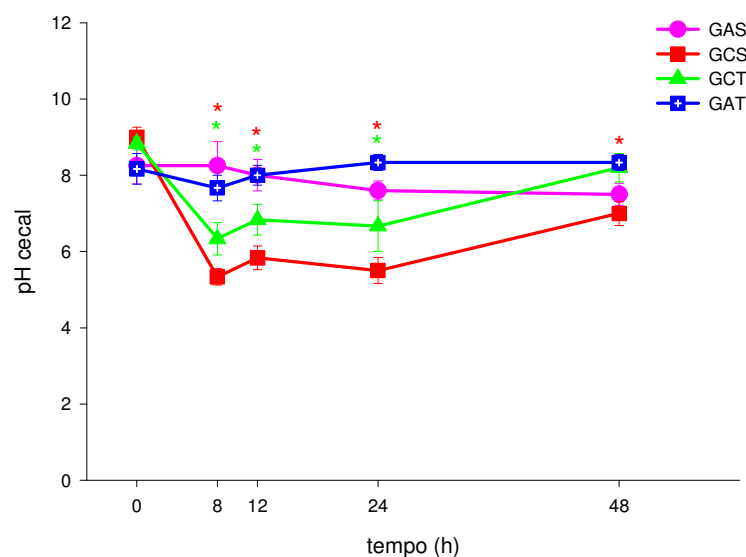


Figura 22 – Representação gráfica dos valores médios ($\pm DP$) do pH cecal em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

2.4. DISCUSSÃO

A determinação dos intervalos de avaliação estabelecidos dentro do período experimental foi fundamentada em estudos anteriores onde se definiu que a partir de 12 horas após a administração do CHO já é possível observar sinais clínicos do desenvolvimento da laminite, representado pelo grau 1 de Obel alcançando escores mais elevados dentro de 48 horas (GARNER et al., 1975; SPROUSE et al., 1987; MARTINS FILHO, 2002). De fato, os animais do grupo controle-CHO (GCS) apresentaram grau 1 de Obel a partir de 12 horas após o CHO alcançando o grau 3 de Obel já a partir de 24 horas. Particularmente, a escolha do período de 8 horas para a administração da solução tampão foi pautada em estudos onde a laminite induzida por extrato de NP definiram este período para início das alterações primárias da laminite (GALEY et al., 1991).

De maneira geral, a avaliação do grupo controle tratado com tampão (GAT) possibilita afirmar que, apesar de ter sido observado alteração em alguns parâmetros dos eqüinos deste grupo, como por exemplo cloro e magnésio, essas alterações não foram suficientes o bastante para serem consideradas deletérias. O aumento observado nas concentrações de magnésio no sangue dos animais desse grupo provavelmente deveu-se à ausência de redução drástica do pH intracecal na qual essa substância reagiria. Dessa maneira, pode-se supor que ficaram disponíveis para absorção através da parede do trato gastrintestinal, corroborando as observações de estudo realizado com ratos, onde o ceco e o cólon demonstraram grande capacidade em absorver magnésio (OHTA et al., 1970).

A exposição à sobrecarga de CHO nos moldes descritos por MARTINS FILHO (2002) causou laminite em 100% dos eqüinos confirmando, uma vez mais, a eficiência deste modelo para o estudo desta afecção e sua ampla utilização nas últimas décadas (GARNER et al., 1975; SPROUSE et al., 1987; BAILEY et al., 2002; MARTINS FILHO, 2002; EADES et al., 2006).

O intervalo de tempo decorrido para o início dos sinais de claudicação característicos do grau 3 de Obel foi entre 24 e 48 horas. O quadro clínico, assim como suas características evolutivas foram semelhantes ao descrito em estudos anteriores, nos quais a média entre o tempo de administração da sobrecarga de CHO e o início do

grau 3 de Obel variou, entre os estudos, de 30 a 48 horas (GARNER et al., 1975; SPROUSE et al., 1987; MARTINS FILHO, 2002).

Apesar de todos os animais que receberam a sobrecarga de CHO (GCS e GCT) terem demonstrado sinais de laminite aguda, as alterações clínicas foram distintas com relação à média de tempo entre a administração do CHO e o início da claudicação. A maior latência demonstrada pelo grupo que recebeu o tratamento com a solução alcalinizante pode ter sido resultante da capacidade redutora dos álcalis $Al(OH)_3$ e $Mg(OH)_2$ nela contidos. Tais compostos constituem bases fracas que tamponam íons hidrogênio de ácidos orgânicos e são amplamente utilizados na estabilização ou manutenção do pH (ARMENTANO & SOLORZANO, 1988; STAPLE & LOUGH, 1989).

A fermentação do CHO no ceco eqüino causa crescimento exacerbado de bactérias Gram-positivas, aumentando a concentração de ácido láctico que, subseqüentemente, leva à diminuição do pH cecal entre três e 12 horas após a sobrecarga de CHO (GARNER et al., 1978; MOORE et al., 1979). O pH baixo e o conteúdo cecal altamente ácido alteram a permeabilidade da mucosa cecal, permitindo a absorção de inúmeras substâncias contidas no trato gastrintestinal consideradas deflagadoras da laminite (WEISS et al., 2000), entre eles, exotoxinas produzidas por bactérias Gram-positivas supostamente responsáveis pela ativação de MMPs que degradam a membrana basal (MUNGALL et al., 2001) ou mesmo outros compostos que reduzem a perfusão digital nos estágios prodrômicos da doença (HOOD et al., 2001).

A acidose severa do trato gastrintestinal, caracterizada pelo acúmulo de ácido láctico e a reduzida concentração de ácidos graxos voláteis, não ocorrem uniformemente em todos os animais que recebem a sobrecarga de CHO (AITCHISON et al., 1987). Esta variação entre os animais para desenvolver acidose cecal em resposta à exposição de concentrações elevadas de grãos é similar à variação entre os animais para desenvolver laminite em resposta ao CHO, como demonstrado por GARNER et al. (1975). Este dado fornece fortes evidências de que a acidose intestinal possa ser o evento primário que leva ao desencadeamento da laminite, pois foi detectada redução do pH cecal em ambos os grupos com laminite induzida por sobrecarga de CHO no presente estudo, corroborando essa hipótese. A diminuição no pH cecal em menor intensidade no grupo CHO-tampão (GCT), comparado ao grupo controle-CHO (GCS),

nos leva a supor que a solução tampão previniu a redução drástica do pH devido à fermentação do excesso de CHO. De certo, estes achados podem reforçar a idéia de que a diminuição do pH cecal participe, em parte, do mecanismo de instauração da laminite associada com a sobrecarga de CHO (ROWE et al., 1994).

Os animais de ambos os grupos com laminite induzida manifestaram sinais de dor, sendo que a intensidade relacionou-se diretamente com a progressão e severidade da doença, cuja claudicação durante o período experimental assemelhou-se àquela descrita por Obel (1948). Inicialmente, esses sinais caracterizaram-se pela troca de apoio intermitente do membro e, posteriormente, por sinais de sensibilidade ao caminhar e andar característico de laminite, evoluindo para claudicação severa, relutância em locomover-se e por fim, incapacidade em manter-se em posição quadrupedal, passando a maior parte do tempo em decúbito.

Os sinais comportamentais de dor aguda e severa têm sido bem caracterizados em eqüinos, associadas à elevação das freqüências cardíaca e respiratória, aumento da pressão sangüínea e da temperatura corporal (DOBROMYLSKYJ et al., 2000; SCHATZMANN, 2000). Na laminite aguda, o sinal mais evidente de dor caracteriza-se pela alternância do apoio do peso sobre os membros torácicos (HOOD et al., 2001). Corroborando essas evidências está a redução na intensidade da dor digital uma hora após a administração de AINEs, em cavalos acometidos por laminite, com cocomitante redução na freqüência da troca de apoio entre os membros torácicos e na freqüência cardíaca média (RIETMANN et al., 2004).

De fato, existe aumento significativo tanto na freqüência cardíaca como da pressão arterial sistêmica e do débito cardíaco durante a laminite (GARNER et al., 1977; HARKEMA et al., 1978; CLARKE et al., 1982). Estas alterações são interpretadas como sendo consistentes com a resposta ao estresse imposta pela doença primária ou pela dor associada com a laminite ao invés de serem causadas pela doença digital em si. De maneira semelhante, os grupos com laminite induzida apresentaram aumento na freqüência cardíaca entre 24 e 48 horas após a administração do CHO. Esta alteração esteve, possivelmente, relacionada à presença de dor demonstrada pelos animais nos respectivos momentos, semelhantemente ao observado por MARTINS FILHO (2002) utilizando o mesmo modelo experimental.

O aumento na temperatura retal observado 8 horas após a administração do CHO pode estar relacionado tanto à manipulação dos animais quanto à variação temperatura ambiente visto que esse aumento ocorreu em todos os grupos. Por outro lado, o aumento na temperatura retal 12 horas após a sobrecarga de CHO pode estar relacionado à pirógenos na corrente sangüínea em concordância com observações de estudos anteriores (GARNER et al., 1975; GARNER et al., 1978; MARTINS FILHO, 2002).

As alterações da motilidade cecal e o aparecimento da diarréia coincidiram, em ambos os grupos com laminite induzida, com a redução do pH cecal. As alterações da microflora cecal podem trazer como conseqüência a endotoxemia e a fermentação do CHO pelas bactérias cecais levando à acidose láctica, aumentando a osmolaridade do líquido cecal e causando efluxo de líquido do compartimento extra e intravascular para o lúmen intestinal. As alterações clínicas observadas em cavalos acometidos pela laminite aguda por sobrecarga de CHO, entre elas, desequilíbrio hidroeletrólítico e hemoconcentração (HOOD, 1980) também foram registradas neste estudo, principalmente pelas mudanças na perfusão periférica e na freqüência cardíaca, que poderiam ser justificadas pelo extravasamento de líquido para o lúmen intestinal alterando a consistência das fezes.

Quando comparamos os grupos com laminite induzida por sobrecarga de CHO (GCS e GCT) é possível considerar que o início precoce do aumento da motilidade cecal, coloração verde-esbranquiçada das fezes, depressão e desconforto abdominal seguido de diarréia demonstrados pelos animais do grupo CHO-tampão (GCT) possam ter sido desencadeados pela ação catártica do $Mg(OH)_2$. Sabe-se que, em humanos, a ingestão excessiva de magnésio causa diarréia, uma vez que essa substância age como um agente osmótico catártico (SAUNDERS & WIGGINS, 1983; FINE et al., 1991). A motilidade aumentada e a diarréia precoce causam aumento na velocidade do esvaziamento cecal, o que pode ter reduzido o tempo de permanência da solução tampão no ceco, fato que pode ter reduzido sua capacidade tamponante. Por outro lado, apesar do início do aparecimento dos sinais de laminite (grau 1 de Obel) terem sido atrasados pela presença do tampão, este parece não ter sido capaz de evitar o desencadeamento da laminite ao final do período experimental.

O aumento do hematócrito apresentado 48 horas após o CHO está em concordância com os relatos de que ele permanece inalterado nos períodos iniciais da doença, alterando-se mais tardiamente (HARKEMA et al., 1978; HOOD, 1999a; HOOD, 1999b). Estudos demonstraram aumento do hematócrito e das proteínas totais 24 horas após a administração do CHO e previamente ao início do grau 3 de OBEL (GARNER et al., 1978), provavelmente devido à perda de líquido do leito vascular para o lúmen intestinal. Este aumento no hematócrito, juntamente com as alterações no fluxo sanguíneo poderiam explicar as alterações na coloração da mucosa oral e no TPC observadas nos grupos GCS e GCT em nosso estudo entre 12 e 48 horas após a sobrecarga de CHO, semelhante ao que tem sido reportado em outros estudos (YELLE, 1986; MARTINS FILHO, 2002).

Analisando os valores do eritrograma (número de hemácias, hemoglobina e hematócrito) nos eqüinos acometidos com laminite, notou-se que eles apresentaram valores maiores aos dos eqüinos controles entre 24 e 48 horas. Segundo FESSLER et al. (1982); LASSEN & SVARDDSON (1995) e BROWN & BERTONE (2002) essa elevação se deve à hemoconcentração (desidratação e choque) e à contração esplênica. Como no presente estudo foi observada diarreia nos eqüinos dos grupos GCS e GCT em momentos coincidentes com o aumento nos valores do eritrograma, com conseqüente desidratação, esta, possivelmente, tenha sido a causa desta elevação.

A contagem total e diferencial de leucócitos nos estágios prodrômicos e agudo da laminite têm sido amplamente estudados. Os valores leucocitários dos grupos GCS e GCT aumentaram entre oito e 48 horas quando comparado com o grupo controle, ocorrendo de forma mais precoce do que o descrito por GARNER et al. (1975) que relataram aumento na contagem de leucócitos entre 24 a 40 horas. De forma semelhante, WEISS et al. (1995, 1997) demonstraram aumento no número de leucócitos entre 28 e 32 horas após a sobrecarga de CHO. Em nosso estudo, esse aumento no número de leucócitos ocorreu principalmente por causa do aumento de neutrófilos, resultado também observado em estudos anteriores (HOOD, 1995a; HOOD, 1995b; MARTINS FILHO, 2002). O aumento de neutrófilos na corrente sanguínea pode ser devido à liberação de quimiocinas mobilizando neutrófilos maduros e imaturos do

estoque medular, mediados pela ação da adrenalina e corticóides endógenos (JOHNSON, 1971).

A resposta inflamatória sistêmica induzida pela sobrecarga de CHO provavelmente não tenha sido intensa o suficiente para causar aumento na proteína sangüínea total, especialmente àquelas de fase aguda como citado anteriormente (FAGLIARI et al., 1998), tampouco levou à alteração de enzimas relacionadas às alterações musculares esqueléticas e renais.

Todavia, as concentrações do lactato plasmático elevaram-se precocemente (oito horas) no grupo que recebeu o CHO e somente a partir das 12 no grupo que recebeu o CHO e o tratamento tampão e o pH sangüíneo, em ambos os grupos, apesar de permanecer próximo aos valores de referência (7,35 – 7,45) para a espécie (MOORE et al., 1976; DeHEER et al., 2002), apresentou redução significativa com relação ao valor basal a partir de 8 horas no grupo controle-CHO, enquanto no grupo tratado com tampão ela ocorreu somente 24 horas após a sobrecarga de CHO. Essa tendência à acidemia deve-se primariamente ao acúmulo de ácido láctico, como observado anteriormente por MOORE et al. (1979), podendo ser hipotetizado que o tampão tenha sido responsável pelo atraso no aumento do lactato plasmático e na redução do pH, mostrando algum efeito protetor, uma vez que os valores do pH no grupo tratado com solução tampão voltaram aos valores basais após 48 horas. Por sua vez, o aumento no pH sangüíneo observado no grupo GAT demonstra a eficácia da ação tamponante da solução tampão. ROWE et al. (1994), demonstraram aumento nas concentrações de lactato sangüíneo em eqüinos alimentados com dieta à base de grãos. A mesma dieta associada ao antibiótico virginiamicina previniu o aumento do lactato. Esses achados, juntamente com os obtidos neste estudo, reforçam a hipótese de que bactérias produtoras de ácido láctico, encontradas em número elevado no ceco de eqüinos utilizam a sobrecarga de CHO como substrato para aumentar a produção de ácido láctico e estão implicadas na acidificação à qual está relacionada a patogênese da laminite.

A contagem de células nucleadas no líquido peritoneal entre 24 e 48 horas foi maior nos grupos acometidos por laminite que no grupo controle e maior do que o valor considerado normal por FISCHER (1997), BROWN & BERTONE (2002) e DEHEER et

al. (2002), fato que pode ser indicativo de peritonite conforme descrito por KAKU et al. (1983), COYNE et al. (1993), MENDES et al. (1999) e PEIRÓ (2002). A porcentagem de polimorfonucleares neste estudo foi de 65% em ambos os grupos 24 horas após a sobrecarga de CHO, alcançando o valor máximo de 70% às 48 horas, contra 48% observado no grupo controle, o que indica que houve migração celular, possivelmente estimulada pela ativação dos macrófagos peritoneais uma vez que essas células figuram como responsáveis pelo aumento da celularidade no líquido peritoneal (PEIRÓ, 2002), caracterizando uma resposta inflamatória aguda (ADAMS et al., 1980; BROWLOW, 1981; PEIRÓ, 2002).

Por sua vez, o excesso de CHO fermentável induz aumento na população de bactérias Gram-positivas produtoras de ácido láctico e subsequente morte de bactérias Gram-negativas, aumentando dessa maneira, a quantidade de endotoxinas disponíveis no trato gastrointestinal. Sabe-se que acidificação cecal e as endotoxinas alteram a permeabilidade da mucosa cecal (WEISS et al., 1998) permitindo a absorção de substâncias oriundas do lúmen intestinal, entre elas, a própria endotoxina. Sendo assim, a maior população de neutrófilos segmentados poderia ser explicada pela ativação de macrófagos peritoneais em resposta à presença de endotoxina circulante e peritoneal.

O aumento registrado na concentração da glicose peritoneal confirma sua maior concentração no líquido peritoneal conforme descrito por BROWLOW et al. (1981) e VAN HOOGMOED et al. (1999). Na fase prodrômica da laminite, determinam-se condições favoráveis para a proliferação bacteriana no ceco e, conseqüentemente, alteração da microbiota. Os neutrófilos, também denominados microfagócitos, representam os principais agentes na primeira fase de um processo infeccioso (MATOS & MATOS, 1995). A função destas células está intimamente relacionada com o metabolismo da glicose, sendo que os neutrófilos são dependentes do consumo de glicose e da glicólise para suprir suas necessidades energéticas (SCHUSTER et al., 2006). Pode-se considerar que o aumento na glicose detectado no líquido peritoneal tenha ocorrido devido às necessidades energéticas dessas células para que pudessem realizar suas funções, disparando os mecanismos da glicogenólise com conseqüente aumento da glicemia peritoneal. GALLACHER et al. (1995) demonstrou que a melhora

da atividade bactericida dos neutrófilos estaria associado com um aumento da disponibilidade da glicose.

O aumento da atividade da FA no líquido peritoneal pode ser implicado em lesões no fígado e intestinos (DeHEER et al., 2002). Uma vez que ocorrem alterações na membrana cecal devido à sobrecarga de CHO, pode-se sugerir que o aumento na atividade da FA, detectado no LP dos grupos expostos ao CHO, deva-se à desvitalização das camadas da parede intestinal. Considerando-se, ainda, que os leucócitos peritoneais possuem grandes quantidades de fosfatase alcalina, esse aumento pode ser devido à morte dessa população celular relacionada ao insulto endotóxico (PEIRÓ 2002), sendo que isso não se refletiu no sangue devido ao tempo de observação e cessação do insulto com o esvaziamento do ceco (STOCKHAM, 1995, STOCKHAM & SCOTT 2002).

2.5. CONCLUSÕES

O estudo dos sinais clínicos, hemograma, bioquímica e exame do líquido peritoneal de eqüinos com laminite induzida por sobrecarga de CHO e dos eqüinos controle permitiu as seguintes conclusões:

1. O modelo experimental utilizado para indução da laminite foi eficaz em 100% dos eqüinos, permitindo a avaliação precoce da severidade dos eventos sistêmicos e locomotores;
2. O tratamento com o $\text{Al}(\text{OH})_3$ e o $\text{Mg}(\text{OH})_2$, nas dosagens utilizadas não foi capazes de alterar, de maneira deletéria, os parâmetros avaliados em eqüinos controles;
3. O atraso no início da claudicação e na acidificação do pH cecal determinado pela solução tampão deve ser considerado como efeito benéfico;
4. A solução tampão, na dose e via empregados, não foi capaz de evitar o desencadeamento da forma aguda da laminite;

2.6. REFERÊNCIAS³⁰

ADAMS, S.B.; FESSLER, J.F.; REBAR, A.H. Cytologic interpretation of peritoneal fluid in the evaluation of equine abdominal crises. *Cornell Vet.*, v.70, n.3, p.232-246, 1980.

AITCHISON, E.M. et al. Feed antibiotics and buffers to control rumen lactic acid. 2. Predosing. *Proc. Nutr. Soc.* v.46, p.41A, 1987.

ALLEN, D. et al. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.1930-1934, 1990.

ARMENTANO, L.E.; SOLORZANO, L.C. Choice of buffers should be dipped on diet, environment. *Feedstuffs*, v.60, n.3, p.19-62, 1988.

BAILEY, S.R.; MARR, C.M.; ELLIOT, J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *Vet. J.*, v.167, p.129-142, 2004.

BAILEY, S.R.; RYCROFT, A.; ELLIOTT, J. Production of amines in equine cecal contents in an *in vitro* model of carbohydrate overload. *J. Anim. Sci.*, v.80, p.2656-2662, 2002.

BROWN, C.M.; BERTONE, J. *The 5 minutes veterinary consult equine*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p.1154, 2002.

BROWNLOW, M.A.; HUTCHINS, D.R.; JOHNSTON, K.G. Reference values for equine peritoneal fluid. *Equine Vet. J.*, v.13, n.2, p.127-130, 1981.

BROWNLOW, MA. Mononuclear phagocytes of peritoneal fluid. *Equine Vet. J.*, v.14, n.4, p.325-328, 1982.

CLARKE, L.L.; GARNER, H.E.; HATFIELD, D. Plasma volume, electrolyte, and endocrine changes during onset of laminitis hypertension in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.43, n.9, p.1551-1555, 1982.

³⁰ De acordo com as normas da ABNT NBB 6023, agosto de 2002

COYNE, C.P. et al. Isolation of an inhibitor of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity liberated from chemotaxin-stimulated equine white blood cell populations. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p.845-855, 1993.

DEHEER, H.L.; PARRY, B.W.; GRINDEM, C.B. Peritoneal fluid. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D. (Eds). *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. St. Louis: Mosby, 2 ed., p.127-162, 2002.

DOBROMYLSKYJ, P.; FLECKNELL, P. A.; LASCELLES, B. D. et al. 2000: Pain assessment. In: Flecknell, P.A. (eds), *Pain Management in Animals*, pp. 53–79. W.B. Saunders, London, UK.

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. *Am. J. Vet. Res.*, v.67, n.7, p.1204-1211, 2006.

FAGLIARI, J.J. et al. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.1234-1237, 1998.

FESSLER, J.F. et al. Endotoxin-induced change in hemograms, plasma enzymes, and blood chemical values in anesthetized ponies: effects of flunixin meglumine. *Am. J. Vet. Res.*, v.43, p.140-144, 1982.

FINE, K.D; SANTA ANA, C.A.; FORDTRAN, J.S. Diagnosis of magnesium-induced diarrhea. *N Engl J Med*. v.324, n.15, p.1012-1017, 1991.

FISCHER, JR. Advances in diagnostic techniques for horses with colic. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v.13, n.2, p.203-220, 1997.

GALEY, F.D. et al. Nogueira preta (*Juglans nigra*) toxicosis: a model for equine laminitis. *J. Comp. Pathol.*, v.104, p.313-326, 1991.

GALLACHER, S.J. et al. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. *Diabet Med.*, v.12, n.10, p.916-920, 1995.

GARNER, H.E. et al. Equine laminitis and associated hypertension: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.166, p.56-57, 1975.

GARNER, H.E. et al. Lactic acidosis: a factor associated with equine laminitis. *J. Anim. Sci.*, v.45, p.1037-1041, 1977.

GARNER, H.E. et al. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet. J.*, v.10, p.249-252, 1978.

HARKEMA, J.R.; ROBINSON, N.E.; SCOTT, J.B. Cardiovascular, acid-base, electrolyte, and plasma volume changes in ponies developing alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.39, p.741-744, 1978.

HINCKLEY, K.A. et al. Glyceryl trinitrate enhances nitric oxide mediated perfusion within the equine hoof. *J. Endocrinol.*, v.151, p.R1-8, 1996.

HOOD, D.M. Current concepts of the physiopathology of laminitis. *Proc. of AAEP*, v.25, p.13-20, 1980.

HOOD, D.M. Laminitis in the horse. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.15, p.287- 294, 1999a.

HOOD, D.M. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.15, p.321-343, 1999b.

HOOD, D.M.; AMOSS, M.S.; HIGHTOWER, D. Equine laminitis I: Radioisotopic analysis of the hemodynamics of the foot during the acute disease. *J. Equine Med. Surg.*, v.2, p.439-444, 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. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.1167-1172, 2001.

KAKU, M. et al. Enhanced superoxide anion release from phagocytes by muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, v.39, p.559-564, 1983.

LASSEN, E.D.; SVARDDSON, C.J. Hematology and hemostasis in the horses: normal functions and common abnormalities. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v.11, n.3, p.351-390, 1995.

MARQUES, J.A. et al. Use of hyoscine-n-butyl bromide plus romifidine: cardiovascular actions in horses. *Vet. Rec. Londres*, v.142, n.7, p.166-167, 1998.

MARTINS FILHO, J.P. *Avaliação clínica, laboratorial, histológica e do uso da heparina sódica na fase prodrômica da laminite eqüina induzida por sobrecarga de carboidrato*. Jaboticabal; Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Dissertação (Mestrado), p.58, 2002.

MATOS, M.S.; MATOS, P.F. *Laboratório Clínico Médico-Veterinário*. São Paulo: Atheneu, 2 ed., p.67-125, 1995.

MENDES, L.C.N. et al. Experimental peritonitis in horses: peritoneal fluid composition. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, n.3, p.217-221, 1999.

MOORE, J.N. et al. Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis: a preliminary report. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.722-723, 1979.

MOORE, J.N.; OWEN, R.R.; LUMSDEN, J.H. Clinical evaluation of blood lactate levels in equine colic. *Equine Vet. J.*, v.8, n.2, p.49-54, 1976.

OBEL, N. *Studies on the histopathology of acute laminitis*. Almquist and Wiksells, Uppsala, Suécia. 1948.

OHTA, A.; BABA, S.; OHTSUKI, M. et al. In vivo absorption of calcium carbonate and magnesium oxide from the large intestine in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, v.43, n.1, p.35-46, 1997.

PEIRÓ, J.R. *Aspectos clínicos, laboratoriais e inflamatórios da injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) em eqüinos: efeito da lidocaína*. Jaboticabal; Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Dissertação (Mestrado), p.74, 2002.

POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. *Annual Convention American Ferriers Association, 10*. Proc. Kansas City, Missouri. p.99-101, 2001.

POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract*, v.45, p.188-192, 1999.

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

RICE, S.L.; KOEHLER, P.E. Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cervisiae* and *Lactobacillus* species and the production of tyramine in fermented sausages. *J. Milk Food Technol.*, v.38, p.256-258, 1976.

RIETMANN, T.R. et al. The association between heart rate, heart rate variability, endocrine and behavioural pain measures in horses suffering from laminitis. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, v.51, n.5, p.218-225, 2004.

ROBINSON, N.E. et al. Digital vascular responses and permeability in equine alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.37, p.1171-1176, 1976.

ROWE, J.B.; PETHICK, D.W.; LEES, M.J. Prevention of acidosis and laminitis associated with grain feeding in horses. *J. Nutr.*, v.124, p.S2742-S2744, 1994.

SAUNDERS, D.R.; WIGGINS, H.S. Fecal excretion of soluble magnesium by humans. *West J. Med.* v.139, n.5, p.655–656, 1983.

SCHATZMANN, U. 2000: Practical analgesic treatment in horses. In: Hellebrekers, L. J. (eds), *Animal Pain*, pp. 161–179. Van der Wees, Utrecht, NL.

SCHUSTER, D.P. et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2006.

SPEIRS, V.C. *The alimentary tract: clinical examination of horses*. Philadelphia: WB Saunders, p.261-298, 1997.

SPROUSE, R.F.; GARNER, H.E.; GREEN, E.M. Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate induced laminitis. *Equine Vet. J.*, v.19, p.25-28, 1987.

STAPLE, C.R.; LOUGH, D.S. Efficacy of supplemental dietary neutralizing agent for lactating dairy cows: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, p.277-303, 1989.

STOCKHAM, S.L. Interpretation of equine serum biochemical profile results. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v.11, n.3, p.391-414, 1995.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Ames: Iowa State Press, p.610, 2002.

URIBE, A.D.P.D. *Descrição de uma técnica cirúrgica para canulação do ceco de eqüinos e avaliação das suas repercussões clínicas, hematológicas e peritoneais*. . Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, 2004. 66 p. Dissertação (Mestrado).

VAN HOOGMOED, L. et al. Evaluation of peritoneal fluid pH, glucose concentration, and lactate dehydrogenase activity for detection of septic peritonitis in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.214, n.7, p.1032-1036, 1999.

VENUGOPAL, C.S. et al. *In vitro* pharmacologic effect of two endothelin-1 antagonists on equine colonic arteries and veins. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.154-159, 2001.

WEISS, D.J. et al. Effect of a competitive inhibitor of platelet aggregation on experimentally induced laminitis in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.814-817, 1998a.

WEISS, D.J. et al. Transient alteration in intestinal permeability to technetium Tc99m diethylenetriaminopentaacetate during the prodromal stages of alimentary laminitis in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.1431-1434, 1998b.

WEISS, D.J. et al. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.58, p.1376-1380, 1997.

WEISS, D.J. et al. *In vitro* evaluation of intramural arch endothelial cells and hoof keratinocytes. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.858-861, 2000.

WEISS, D.J.; TRENT, A.M.; JOHNSTON, G. Prothrombotic events in the prodromal stages of acute laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.986-991, 1995.

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

CAPÍTULO 3: APOPTOSE DE CÉLULAS EPIDÉRMICAS LAMINARES NA LAMINITE INDUZIDA POR SOBRECARGA DE CARBOIDRATO, APÓS TAMPONAMENTO CECAL, EM EQÜINOS.

RESUMO – O termo apoptose designa um mecanismo de morte celular geneticamente programado e que, fisiologicamente, é parte integral do desenvolvimento embrionário e da regulação da homeostase dos órgãos. Um número aumentado de células da camada basal apoptóticas foi detectado em eqüinos com laminite, podendo ser este um fator importante na fisiopatologia dessa doença. Neste estudo comparou-se o número, tipo, localização e distribuição das células epidérmicas laminares em eqüinos com laminite experimental induzida por sobrecarga de CHO, tratados ou não com solução tampão. Utilizaram-se amostras de tecido laminar digital fixadas em formalina, obtidas de 17 eqüinos distribuídos em quatro grupos experimentais: controle (GAS, n=3); controle tampão (GAT, n=5); controle CHO (GCS, n=5) e CHO-tampão (GCT, n=4). Decorridas 8 horas da indução da laminite, administrou-se a solução tampão diretamente no ceco. Os eqüinos dos quatro grupos foram sacrificados 48 horas após a administração do amido. Tecidos laminares, embebidos em parafina, foram corados pela técnica de marcação *in situ* da fragmentação do DNA (TUNEL). A confirmação da apoptose foi realizada por técnica de imunohistoquímica (caspase-3 e 14). O número de células epidérmicas positivas pela técnica de TUNEL por 0,1 mm de lâmina epidérmica primária foi maior nos grupos GCS e GCT do que no GAS. O número de células basais foi quatro e seis vezes maiores nos grupos GCT e GCS, respectivamente; o número de queratinócitos foi duas vezes maior em ambos os grupos, em relação ao GAS. O número elevado de células apoptóticas da camada basal detectadas no tecido laminar de eqüinos com laminite sugere que a apoptose participa das lesões laminares. O número elevado de queratinócitos detectados na interface das lâminas epidérmicas primárias e secundárias em eqüinos com laminite necessita ser esclarecido. Com base nos achados deste estudo, concluiu-se que a administração intracecal de solução tampão diminuiu a intensidade do processo apoptótico em eqüinos com laminite experimental. No entanto, esse tratamento não preveniu o aumento desse tipo de morte

celular comparado ao grupo controle. Independentemente, a diminuição na intensidade da morte celular por apoptose em eqüinos com laminite deve ser considerada um fato de relevância desse estudo.

Palavras-chave: laminite, apoptose, eqüino.

Apoptosis in epidermic lamellar cells in horses with carbohydrate-overload induced laminitis after cecal treatment with buffering solution.

SUMMARY - The aim of this study was to compare the number, type, location and distribution of apoptotic epidermic lamellar cells in clinically normal horses and those with carbohydrate-overload (CHO) induced laminitis either with saline solution or buffering solution. Formalin-fixed samples of digital lamellar tissues collected from 17 horses divided among four treatment groups: negative control (WS, n=3); positive buffer control (WB, n=5); CHO-induced laminitis (CS, n=5); and CHO-induced laminitis with buffer treatment (CB, n=4). In the buffer treatment groups, buffer was administered immediately following the 8-hour time point. Blocks of paraffin-embedded lamellar tissue were stained for DNA fragmentation with the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) technique. Differential immunohistochemical staining for caspase 3 and 14 were used to confirm the presence of apoptosis and the absence of differentiation. The number of TUNEL-positive epidermic cells per 0.1 mm of primary laminae was significantly greater in the acute laminitis groups (CS and CB) than in the control group (WS). The number of basal layer cells was 4 and 6 times as many in CB and CS group, respectively, compared with the control group. The number of keratinocytes was 2 times as many in both CB and CT groups, compared with the control group. Apoptosis of TUNEL-positive basal layer cells was confirmed by results of caspase 3 immunohistochemical staining. The TUNEL-positive keratinocytes did not stain for caspases 3 or 14. The large number of apoptotic basal layer cells detected in the lamellar tissue of horses with carbohydrate-overload (CHO) induced laminitis either with saline solution or buffering solution suggests that apoptosis may be important in the development of acute laminitis. The role of the large number of TUNEL-positive keratinocytes detected in the interface of primary and secondary epidermic laminae of horses with acute laminitis needs to be elucidated.

Based on the results of this study, we concluded that although buffer treatment did not prevent the increased amount of apoptotic cells compared with control group, it was lower compared with those laminitic horses that did not receive the buffer treatment.

In this way, the decreased number of apoptotic cells in buffer group should be considered an important result of this study.

key words: laminitis, apoptosis, equine, carbohydrate.

3.1. INTRODUÇÃO

A laminite aguda é uma doença das lâminas do casco altamente debilitante e dolorosa que acomete eqüinos e pôneis de todas as raças, independente do tipo de atividade que eles realizam. Em 54% dos casos sua ocorrência é secundária a doenças intestinais das mais variadas etiologias, podendo ainda ocorrer após sobrecarga de CHO, retenção de placenta, metrite e outras doenças que possam causar endotoxemia (SLATER et al., 1995).

Apesar do grande número de pesquisas sobre laminite publicadas nas últimas décadas, questões sobre os mecanismos fisiopatológicos permanecem sem resposta. Estudos realizados durante as décadas de 70 do século passado, relacionaram a redução do pH cecal com o aumento das concentrações plasmáticas de endotoxina, em eqüinos com laminite experimental induzida por sobrecarga de CHO (GARNER et al., 1978; MOORE et al., 1979). Foi demonstrado também, aumento das concentrações plasmáticas de lactato (GARNER et al., 1977; capítulo 2) e de endotoxina (MOORE et al., 1979) concomitantemente ao desenvolvimento de sinais clínicos de laminite nesse modelo.

Ao longo das últimas décadas, esses efeitos clínicos relacionados ao choque endotoxêmico tornaram-se a principal justificativa para a laminite secundária às doenças gastrintestinais. Atualmente, existem duas teorias principais sobre a fisiopatologia da laminite aguda: a teoria metabólica e a vascular. A teoria metabólica propõe que toxinas circulantes ou enzimas associadas com a doença primária possam agir diretamente no epitélio laminar cornificado resultando em dano e perda de células basais necessárias para a integridade da membrana basal (HOOD, 1999). Hipoteticamente, o fornecimento de substrato fermentativo em excesso causaria a proliferação de bactérias e aumento da produção de ácido láctico; a diminuição do pH cecal levaria a morte de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e, conseqüentemente a liberação de endotoxinas e exotoxinas, as quais poderiam atravessar a barreira mucosa do ceco alterada e alcançar a circulação sistêmica (HUNT, 1991).

Nos últimos anos, foram encontradas evidências sobre a ativação das enzimas MMP por exotoxinas (proteínases) de bactérias Gram-positivas do gênero

Streptococcus spp., mais especificamente *Streptococcus bovis*. Essas enzimas são capazes de degradar componentes da membrana basal, causando o descolamento das células epidermais basais induzindo, na seqüência, falência da estrutura do casco (ADAIR et al., 2000; MUNGALL et al., 2001). As concentrações altas de exotoxinas devido à morte de *Streptococcus spp* parecem participar como promotoras da produção de MMP (POLLITT, 1999).

A teoria vascular propõe que um distúrbio no fluxo sanguíneo digital dá início a fase podrômica da laminite, resultando em um processo de isquemia e reperfusão podendo levar ao dano e inflamação das células epidermais com desenvolvimento secundário de hiperemia e falência estrutural, supostamente devido ao dano na membrana basal (HOOD, 1999). Evidências apontam para um episódio bifásico da isquemia laminar interrompido por um período de hiperemia nos estágios precoces da laminite induzida por extrato de NP, sugerindo que a injúria de reperfusão contribui para o desenvolvimento da laminite (ADAIR et al., 2000).

Apoptose, uma palavra desconhecida para a maioria há alguns anos, atualmente figura nos principais compêndios da Ciência moderna, conferindo prêmio NOBEL ao pesquisador ROBERT HORVITZ (2002), devido à descoberta de sua relação com o câncer, doenças degenerativas e doenças auto-imunes.

O termo apoptose foi proposto primeiramente para descrever uma forma distinta de morte celular, com aspectos morfológicos característicos, que diferem da necrose (KERR et al., 1972). Células que estão morrendo pelo processo de apoptose desenvolvem processo ativo de fragmentação com condensação da cromatina, vacuolização da membrana e contração da célula com formação de extrusões em sua superfície (processo chamado de zeiose). Os fragmentos resultantes dessa membrana encapsulada são chamados corpos apoptóticos. É caracterizada pelo encarquilhamento do núcleo (picnose), ou sua fragmentação (cariorexis), alteração da permeabilidade da membrana plasmática a corantes não vitais e vitais e dissolução citoplasmática lenta, sem os fenômenos abruptos que caracterizam a lise celular (KERR et al., 1972; CLARKE, 1990; TERAKI & SHIOHARA, 1999).

A apoptose difere ainda da necrose por ser um processo ativo de característica silenciosa, ou seja, as células em apoptose não desencadeiam um processo

inflamatório, como o fazem aquelas em processo de necrose. Em geral, as células apoptóticas são reconhecidas por macrófagos e são ingeridas antes que se desintegrem. Isso evita o derrame do conteúdo celular e, assim, não há inflamação e lesão do tecido, garantindo o seu funcionamento normal (MEAGHER et al., 1992; COHEN, 1993; FADOK & HANSON, 1998). As células que demoram a morrer podem sofrer outras mudanças: o núcleo parte-se e a célula também se divide em estruturas contendo porções do núcleo, os chamados corpos apoptóticos, tomando uma forma inconfundível ao microscópio eletrônico (KERR et al., 1972; CLARKE, 1990; TERAKI & SHIOHARA, 1999).

Apoptose é um tipo de auto-destruição celular que requer energia e síntese protéica para a sua execução, estando relacionada com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose (BRAS et al., 2005). O termo apoptose é derivado do grego, que referia-se à queda das folhas das árvores no outono - um exemplo de morte programada fisiológica e apropriada que também implica em renovação (KERR et al., 1972).

Esse fenômeno biológico tem papel importante em diversos processos vitais e em inúmeras doenças. Como um mecanismo sistêmico de limpeza é necessário tanto para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares durante a embriogênese quanto para a manutenção da homeostase tecidual em adultos (PHILCHENKOV, 2004). Ocorre na organogênese, na renovação de células epiteliais e hematopoiéticas, na involução cíclica dos órgãos reprodutivos da mulher, na atrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou hormônios, na involução de alguns órgãos e, ainda, na regressão de tumores (HOPKINSON-SON-WOOLEY et al., 1994; HORTA, 1999). Portanto, consiste em um tipo de morte programada, desejável e necessária que participa na formação dos órgãos e que persiste em alguns sistemas adultos como a pele e o sistema imunológico.

Por ser indispensável à vida, a morte da célula deve seguir um plano meticuloso e qualquer distúrbio de sua regulação (tanto o excesso quanto a insuficiência) pode provocar uma variedade de doenças entre elas doenças neurodegenerativas, lesões secundárias a isquemia, doenças auto-imunes entre outras. Um fato interessante é que a remoção de certas células apoptóticas não ocorre imediatamente, continuando no

local às vezes por toda a vida. É o caso dos queratinócitos, células da camada externa da pele. Ao migrar de camadas mais profundas para a superfície, eles morrem por apoptose, mas durante o processo substituem seu conteúdo por queratina ganhando uma capa impermeável. Assim, a camada protetora externa da pele é constituída de células mortas, descamadas e trocadas por outras, em média, a cada 21 dias (HORTA, 1999).

Certas proteases, recentemente chamadas de caspases têm importância central na apoptose, em todo o tipo de célula e em todo o organismo multicelular já estudado. As caspases constituem uma família de proteases caracterizadas por um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico, uma especificidade incomum entre proteases. O nome caspase é derivado dessa função molecular característica: cysteine-aspartic-acid-proteases (BANTEL et al., 1998).

As caspases podem ser divididas em caspases inflamatórias ou apoptóticas, as quais podem ser subdivididas em iniciadoras e efetoras. Caspases são os sensores executores essenciais da apoptose celular. Uma caspase pode clivar outras caspase, sendo esse processo essencial à ativação dessas enzimas. Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outras, em cascata, até gerar uma caspase executora que destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose levando à morte celular (CREAGH et al., 2003).

Várias proteínas são apontadas como alvos das caspases, mas ainda não foi estabelecida uma relação direta entre a clivagem dessas proteínas e a morte celular. A caspase três, por exemplo, cliva a ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) normalmente ligada a uma endonuclease (CAD) no citoplasma, ativando essa enzima, que entra no núcleo e começa a clivar o DNA (ENARI et al., 1998). Outra relação direta já identificada é a clivagem, também pela caspase três, da gelsolina, uma proteína ligada aos filamentos de actina (parte do citoesqueleto, que mantém a estrutura normal da célula). Essa clivagem danifica os filamentos e a célula perde sua forma, o que leva a apoptose (BOCELLINO et al, 2004).

A apoptose pode ser acionada por vários tipos de gatilhos, sendo um deles a ausência dos sinais químicos que mantêm a célula em atividade e em multiplicação, os chamados fatores de crescimento (BANTEL et al., 1998). Na grande maioria das células

em apoptose observa-se a destruição do ácido desoxirribonucléico (DNA). As células eucariotas têm cromossomos formados por unidades repetitivas, os nucleossomas e antes da morte da célula, o DNA é cortado por enzimas (endonucleases) em regiões específicas entre os nucleossomas (BANTEL et al., 1998).

Embora o significado da apoptose em vários estados mórbidos seja um território desconhecido, sua importância vem se tornando evidente em muitas afecções, incluindo a insuficiência cardíaca congestiva, a arteriosclerose, a lesão da reperfusão isquêmica e o acidente vascular cerebral (WEINBERG, 1999).

Embora centenas de artigos relacionados ao papel da apoptose nos processos fisiológicos e nas enfermidades venham sendo publicados em diversas espécies, são poucas as informações sobre a apoptose em eqüinos, limitando-se aos aspectos da fisiologia reprodutiva (AL-ZI'ABI et al., 2002; DELL'AQUILA et al., 2003; PEDERSEN et al., 2003) e do exercício (BOFFI et al., 2002), crescimento de condrócitos (HENSON et al., 1997), infecção viral (BENDALI-AHCENE et al., 1997; JACKSON & ROSSITER, 1997; ARCHAMBAULT & ST-LAURENT, 2000; LIN et al., 2001; LIN et al., 2002), tumores melanocíticos (ROELS et al., 2000) e doenças do trato gastrintestinal (RITCHER et al., 2002; ROWE et al., 2003). No entanto, FALEIROS et al. (2004) foram responsáveis pelos primeiros relatos sobre apoptose na lâmina do casco de eqüinos saudáveis ou acometidos pela laminite.

O método de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) é uma técnica de coloração amplamente utilizada, onde a avaliação microscópica do número de células positivas é relativamente fácil. Esse método é baseado na desfragmentação do DNA e envolve a detecção do terminal 3'-OH por meio da adição de nucleotídeos marcados a esses terminais pelo uso do anticorpo monoclonal terminal "deoxynucleotidyl" transferase (TdT). Esse ensaio tem sido amplamente utilizado para detectar a fragmentação do DNA associada com a apoptose em cortes teciduais parafinados (FALEIROS et al., 2004) e em várias investigações científicas envolvendo eqüinos (ROELS et al., 2000, AL-ZI'ABI et al., 2002; BOFFI et al., 2002; ROWE & WHITE, 2003).

No entanto, os resultados obtidos a partir dessa técnica devem ser interpretados com precaução, uma vez que os sinais positivos para a coloração de TUNEL podem ser

detectados também em células necróticas e células em processo fisiológico de diferenciação. Para minimizar os erros de interpretação dos resultados, tem se utilizado, adicionalmente, a imunolocalização de diferentes tipos de caspases para se distinguir queratinócitos apoptóticos daqueles que estão em processo fisiológico de diferenciação (HATHAWAY & KUELCH, 2002). A caspase três, por exemplo, tem sua forma ativa expressa somente em células que estão em processo de apoptose, ao passo que a caspase-14 tem expressão tecidual restrita no processo fisiológico de diferenciação terminal de queratinócitos. Supostamente, queratinócitos normais sob um processo fisiológico de diferenciação deveriam expressar somente caspase-14, e células apoptóticas deveriam expressar a forma ativa de caspase três (HATHAWAY & KUELCH, 2002).

A hipótese aqui estudada foi que a administração de uma solução tampão poderia diminuir a ocorrência de apoptose em células epidermais das lâminas do casco em equinos submetidos à sobrecarga de CHO. Assim, objetivou-se com esse estudo comparar o número, tipo, localização e distribuição das células epidermais lamelares apoptóticas em eqüinos com laminite experimental induzida por sobrecarga de carboidrato, tratados ou não com solução tampão quando comparados aqueles clinicamente sadios tratados ou não com solução tampão.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Amostras

Amostras de tecido laminar foram coletadas de 17 eqüinos, seis machos castrados e 11 fêmeas não-gestantes, sem raça definida, adultos, hípidos, com idades variando de três a nove anos, pesando entre 200 e 410 kg e com escore corporal de três a quatro, segundo SPEIRS (1997). Esses animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: controle (GAS, n=3); controle tampão (GAT, n=5); controle CHO (GCS, n=5); CHO-tampão (GCT, n=4), conforme descrito no capítulo 2.

Após um período experimental de 48 horas, os animais foram sacrificados por meio da administração de EGG (120 mg/kg) seguida da infusão rápida de tiopental sódico¹ (20mg/kg) e solução saturada de cloreto de potássio, todos por via intravenosa. Procedeu-se a separação dos cascos por desarticulação metacarpofalangeana. Os cascos foram lavados e seccionados com fita de serra, de acordo com protocolo descrito previamente por POLLITT (1996). Obtiveram-se fragmentos retangulares da muralha interna, com lados medindo 1,0 x 0,5 cm e espessura de 0,1 cm, contendo a interface entre as lâminas dérmicas e epidérmicas.

3.2.1.a. Preparo das amostras

Imediatamente após a coleta, os tecidos laminares foram fixados em formalina 10%, posteriormente desidratadas com álcool 70% e incrustadas em parafina após um período de 24 horas. Os tecidos parafinados foram submetidos a cortes histológicos de 5 µm de espessura por meio de micrótomo e as lâminas provenientes colocadas em estufa a 37 °C durante um período de 12 horas.

3.2.2. Metodologia de TUNEL

Nos cortes histológicos foi verificada a presença de células em processo de apoptose por meio do método de TUNEL (PARTON et al., 2001) utilizando-se de “kit” comercial² de acordo com as etapas a seguir:

¹ Tiopentax – Cristália, Campinas – SP.

² Apoptag, serologicals Co, Norcross, Ga.

- a) Desparafinização dos cortes histológicos: as lâminas contendo os cortes histológicos foram submetidas a três banhos em xilol durante 5 minutos cada; dois banhos em álcool absoluto durante 5 minutos cada, um banho em álcool 95% e um em álcool 70% durante 3 minutos cada, essa última etapa para reidratação dos cortes teciduais.
- b) Preparação dos cortes histológicos: foi aplicado sobre os cortes histológicos solução de proteinase K³ (20 ug/ml) diluída em tampão salina-fosfato (PBS) deixando agir durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse período as lâminas foram submetidas a dois banhos com água deionizada (dH₂O) durante 2 minutos cada.
- c) Inativação da peroxidase endógena: nesta etapa as lâminas foram submetidas a um banho em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% diluída em PBS durante 5 minutos em temperatura ambiente (20-22 °C). Após esse período as lâminas foram enxaguadas em dois banhos de PBS durante 5 minutos cada.
- d) Equilíbrio da reação: foram aplicados sobre os cortes histológicos 75 uL de solução "Equilibration Buffer" incubando as lâminas em temperatura ambiente (20-22 °C) durante 10 segundos.
- e) Marcação da reação: foram aplicados sobre os cortes histológicos 55 uL/5 cm² de tecido de solução "Working Strenght TdT Enzime", incubando as lâminas em estufa a 37° C durante 1 hora.
- f) Interrupção da reação: para parar a reação as lâminas foram colocadas em banho contendo solução "Working Strenght Stop/Wash Buffer" e agitadas durante 15 segundos, após o que foram incubadas em temperatura ambiente (20-22 °C) durante 10 minutos.
- g) Detecção do DNA fragmentado: as lâminas foram submetidas a três banhos em PBS durante 1 minuto cada. Após isso, foram aplicados 65 uL/5cm² de tecido de "Anti-Digoxigenin Peroxidase Conjugate" sobre os cortes histológicos, incubando as lâminas em câmara úmida durante 30 minutos em

³ Sigma Aldrich Co, St Louis, MO, EUA.

temperatura ambiente (20-22 °C). Após esse período as lâminas foram submetidas a quatro banhos com PBS durante 2 minutos cada.

- h) Revelação: foram aplicados 75 $\mu\text{L}/5 \text{ cm}^2$ de tecido de substrato cromógeno 3,3'- diaminobenzidine (DAB) nos cortes histológicos deixando agir durante 6 minutos para coloração em temperatura ambiente (20-22 °C);
- i) Lavagem dos cortes: as lâminas foram submetidas a três banhos em dH_2O durante 1 minuto cada. Feito isso, foram incubadas em dH_2O durante 5 minutos em temperatura ambiente (20-22 °C);
- j) Contracoloração: foi feita mediante imersão das lâminas em solução a 1% de "Methyl Green"⁴ durante 10 minutos em temperatura ambiente (20-22 °C). Após esse período as lâminas foram submetidas a três banhos com dH_2O , mergulhando cada uma 10 vezes no primeiro e no segundo banho, e em seguida sendo agitadas durante 30 segundos no terceiro banho. Feito isso foram submetidas a três banhos em N-Butanol 100% à semelhança dos banhos em dH_2O descrito anteriormente.
- k) Montagem das lâminas: as lâminas coradas foram submetidas a processo de desidratação dos tecidos movendo a lâmina através de três banhos contendo xilol e incubação durante 2 minutos em cada banho. Os cortes foram recobertos, ainda úmidos, com o auxílio de lamínulas.

Como controle positivo para a técnica de TUNEL foram utilizados cortes histológicos da glândula mamária de ratas obtidas quatro dias após a amamentação (fornecidas pelo fabricante juntamente com o "kit" comercial). Como controle negativo foi utilizado cortes de tecido laminar de eqüinos onde a marcação da reação (etapa e) foi omitida.

Para comparar a fragmentação do DNA entre os grupos, foi contado o número de células positivas para a coloração de TUNEL, coradas em marrom, por comprimento da lâmina primária por meio de microscopia óptica quando se verificou a estrutura celular. Para a mensuração do comprimento das lâminas foi utilizada uma ocular reticulada calibrada por uma objetiva micrométrica⁵. Para cada animal foram medidas 15 lâminas primárias e as células positivas para coloração de TUNEL foram contadas. Durante o

⁴ Vector® Methyl Green Nuclear Counterstain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA.

⁵ MBM11100, Nikon, Kawasaki, Japão.

processo de contagem, o comprimento da lâmina primária foi dividido visualmente em três zonas (base, meio e ápice) de tamanhos iguais para a avaliação da localização e distribuição das células apoptóticas.

3.2.3. Ensaio de Imuno-histoquímica Para Detecção da Forma Ativa de Caspase-três e Caspase-14

Para confirmação da presença de células em apoptose, amostras de cortes histológicos também foram submetidas à técnica de imunohistoquímica para detecção da atividade da caspase três e caspase-14 pelo uso do método do complexo da avidina-biotina-peroxidase⁶. Para tanto, foi utilizado um anticorpo contra a forma ativa de caspase três e um anticorpo anti-caspase-14. Esses procedimentos foram realizados com o auxílio de um sistema automático de coloração⁷.

Os cortes foram desparafinados segundo protocolo de rotina e a peroxidase foi inativada por imersão das lâminas contendo os cortes histológicos em banho contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% durante 10 minutos. Após esse período, as lâminas foram incubadas em soro de cabra⁸ durante 30 minutos e depois foram incubadas com anticorpo policlonal purificado de coelho anti-caspase três ativa de humano/camundongo⁹ na proporção de 1:500 ou anticorpo policlonal de coelho anti-caspase-14 humana¹⁰ na proporção de 1:100 durante 30 minutos. Após nova incubação durante 30 minutos com anti IgG biotilado de coelho, a enzima do complexo avidina-biotina-peroxidase foi adicionada e incubou-se as lâminas por mais 30 minutos.

A imunoreatividade foi confirmada como um precipitado vermelho por meio da utilização de substrato de peroxidase¹¹ e a contracoloração foi realizada pelo uso do corante hematoxilina. Todas as etapas do procedimento foram realizadas em temperatura ambiente (20-22 °C). Paralelamente, empregaram-se cortes histológicos de pele de eqüino corados utilizando-se o mesmo protocolo como controle positivo da caspase-14. Tanto nos cortes histológicos de tecido laminar quanto nos de pele de eqüino, os anticorpos primários foram omitidos da reação nos cortes utilizados como

⁶ Vectastain Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA – EUA.

⁷ DAKO Autostainer System, DakoCytomation, Carpinteria, CA - EUA.

⁸ Normal Goat Serum, Vector Laboratories, Burlingame, CA – EUA.

⁹ AF835 R&D Systems, Minneapolis, MO - EUA.

¹⁰ SC-5628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA - EUA.

¹¹ Nova Red, Vector Laboratories, Burlingame, CA - EUA

controle negativo. (EXPLICAR O PQ DO USO DA CASPASE-14). Todas as lâminas foram examinadas em microscópio óptico para identificação da presença e localização das células coradas. (CONTROLE POSITIVO CASPASE 3)

Essas análises foram realizadas nas dependências do Department of Pathobiological Science da School of Veterinary Medicine- Louisiana State University, Baton Rouge, LSU.

3.2.4. Análise Estatística

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e, posteriormente, à análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Neuman-Keuls para comparação das médias (Sigma Stat¹²). Foi considerado um nível de significância de $p \leq 0,05$.

¹² Sigma Stat for Windows, Version 3.0.1. Systat Software Inc. CA - EUA.

3.3. RESULTADOS

A técnica de TUNEL corou dois tipos de células epidermais: as células da camada basal localizadas nas lâminas epidérmicas secundárias e os queratinócitos localizados na margem dos eixos queratinizados das lâminas primárias.

Nas amostras dos animais do GAS e GAT foram detectados raros queratinócitos e poucas células da camada basal com coloração positiva (Fig. 1). Nos grupos GCS e GCT esses mesmos tipos celulares foram frequentemente observados e exibiram coloração intensa nas margens dos eixos queratinizados (Fig. 2). Nos grupos GCS e GCT houve aparente redução na espessura dos eixos queratinizados, comparado com os grupos GAS e GAT. As células epidermais da camada basal mostraram características morfológicas típicas de apoptose, entre elas contração do citoplasma, condensação celular e corpos apoptóticos (Fig. 3). Nos queratinócitos evidências morfológicas característica da apoptose foram pouco detectadas (Fig. 2).

As células com coloração positiva nos cortes de glândula mamária foram intensamente coradas e nos ensaios envolvendo as lâminas para controle negativo de cortes de tecido laminar onde o TdT foi omitido, não se detectou coloração das células.

A distribuição das células com coloração positiva no terço apical, medial e basal da lâmina primária não apresentou diferença dentro dos grupos (Fig. 5). O número total de células epidermais positivas (células da camada basal + queratinócitos) por 0,1 mm de lâmina primária no grupo GAS foi $1,21 \pm 0,10$ e no grupo GAT foi $1,11 \pm 0,06$. Esses valores não diferiram entre esses grupos ($p=0,777$). Nos GCS e GCT o número total de células epidermais positivas foi $6,56 \pm 0,36$ e $4,08 \pm 0,17$, respectivamente e esses valores foram diferentes entre si ($p<0,001$). A média dos grupos expostos à sobrecarga de CHO foi maior ($p<0,001$) do que os grupos controle (GAS e GAT). Resultado semelhante foi observado quando as células da camada basal e os queratinócitos foram analisados isoladamente. Foi detectado um aumento nas células da camada basal e queratinócitos com coloração positiva nos animais expostos ao CHO ($p<0,001$; Fig. 6 e 7).

A coloração da forma ativa da caspase-3 das células da camada basal acompanhou àquela detectada por meio da técnica de TUNEL (Fig. 4). Poucos queratinócitos apresentaram coloração positiva para a forma ativa da caspase três.

Nenhuma célula apresentou coloração positiva para caspase-14, apesar da coloração positiva intensa detectada na epiderme de tecido de eqüinos sadios. Nos controles negativos (sem anticorpos primários) nenhuma célula epidermal apresentou coloração positiva para a caspase três ou para caspase-14.

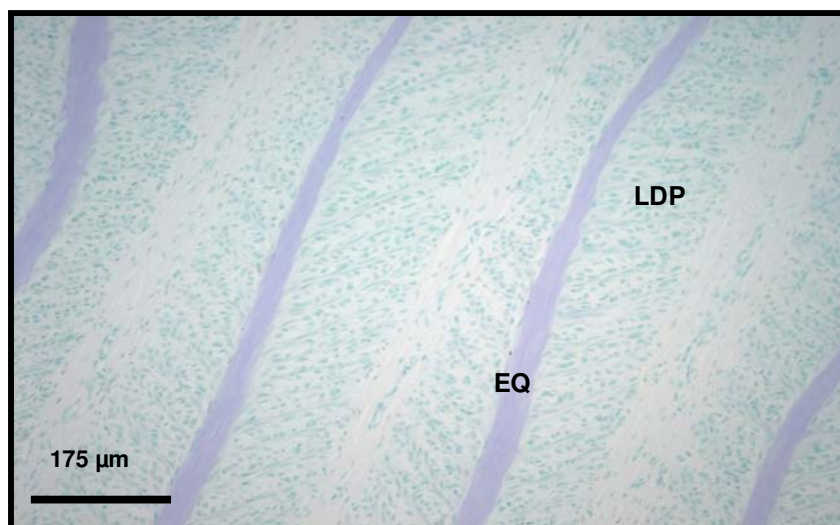


Figura 1: Fotomicrografia de corte histológico de tecido laminar digital de equino clinicamente sadio (GAS), corado pela técnica de TUNEL para identificação da fragmentação do DNA. EQ= eixo queratinizado; LDS=lâmina dérmica primária (barra=175 μm).

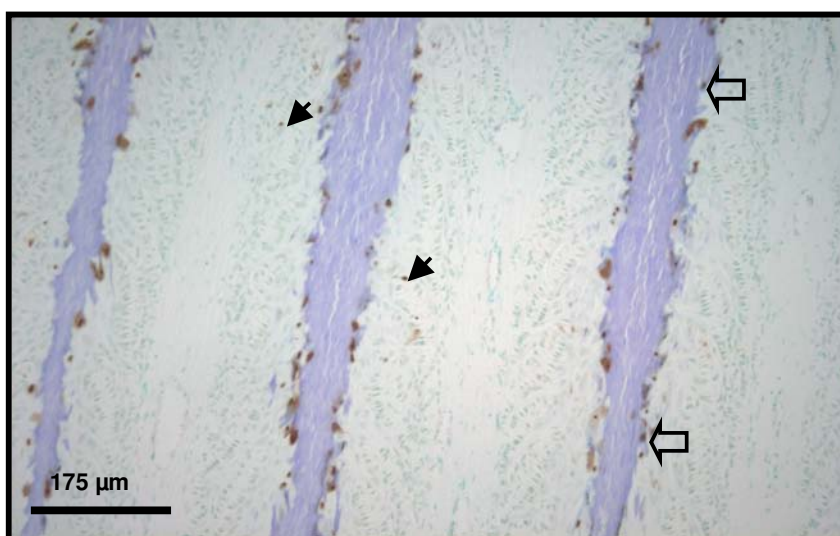


Figura 2: Fotomicrografia de corte histológico de tecido laminar digital corado pela técnica de TUNEL para identificação da fragmentação do DNA, de equinos com laminite experimental. Queratinócitos positivos (setas vazadas) e células da camada basal positivas (seta cheia) (barra=175 μm).

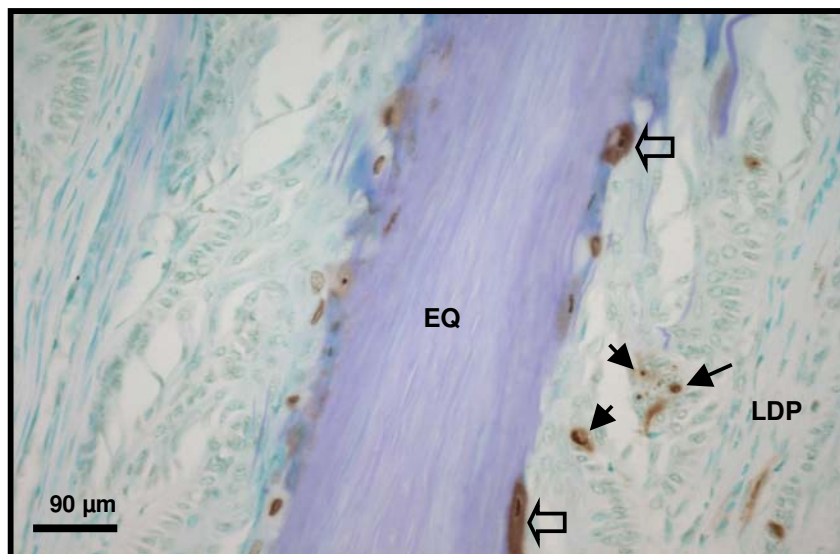


Figura 3: Fotomicrografia de corte histológico de tecido laminar digital corado pela técnica de TUNEL para identificação da fragmentação do DNA, de eqüinos com laminite experimental (GCS). Queratinócitos positivos (setas vazadas) e células da camada basal com corpos apoptóticos e condensação nuclear (seta cheia). EQ= eixo queratinizado; LDS=lâmina dérmica primária (barra=90 µm).

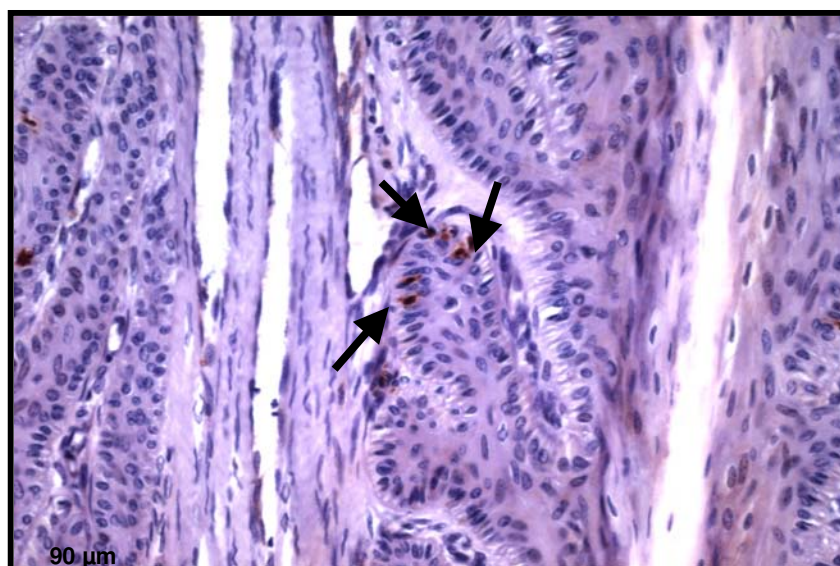


Figura 4: Fotomicrografia de corte histológico de tecido laminar digital corado por imuno-histoquímica para identificação de caspase-3, de eqüinos acometidos por laminite experimental (GCS). Células da camada basal positivas (seta cheia) (barra=90 µm).

Tabela 1 – Média e erro padrão das células epidermais positivas dos terços apical, medial e basal das lâminas primárias do casco de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) 48 horas após a indução da laminite

| GRUPOS | apical | medial | basal | total |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| GAS | 0,49 ^a [0,11] | 0,40 ^a [0,06] | 0,31 ^a [0,02] | 1,21 |
| GAT | 0,39 ^a [0,04] | 0,44 ^a [0,03] | 0,28 ^a [0,03] | 1,10 |
| GCS | 2,22 ^a [0,17] | 2,21 ^a [0,08] | 2,14 ^a [0,14] | 4,73 |
| GCT | 1,42 ^a [0,11] | 1,29 ^a [0,06] | 1,37 ^a [0,09] | 4,08 |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Student- Neuman-Keuls $p \leq 0,05$)

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

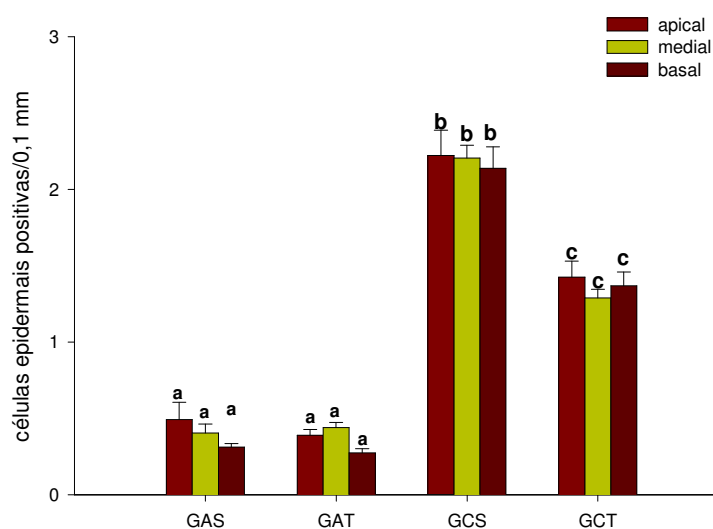


Figura 5 – Representação gráfica dos valores médios (\pm EP) do número de células epidermais positivas dos terços apical, medial e basal das lâminas primárias do casco de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. Letras distintas denotam diferenças entre os grupos (teste Student-Neuman-Keuls $p \leq 0,05$).

Tabela 2 – Média e erro padrão das células da camada basal e queratinócitos das lâminas primárias do casco de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) 48 horas após a indução da laminite.

| GRUPOS | cel. camada basal | queratinócitos | cel. epidermais totais |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| GAS | 0,63 ^a [0,06] | 0,58 ^a [0,15] | 1,21 ^a [0,10] |
| GAT | 0,56 ^a [0,04] | 0,55 ^a [0,08] | 1,10 ^a [0,06] |
| GCS | 4,73 ^b [0,37] | 1,83 ^b [0,06] | 6,56 ^b [0,36] |
| GCT | 2,78 ^c [0,56] | 1,83 ^c [0,14] | 4,08 ^c [0,35] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Student- Neuman-Keuls $p \leq 0,05$)

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

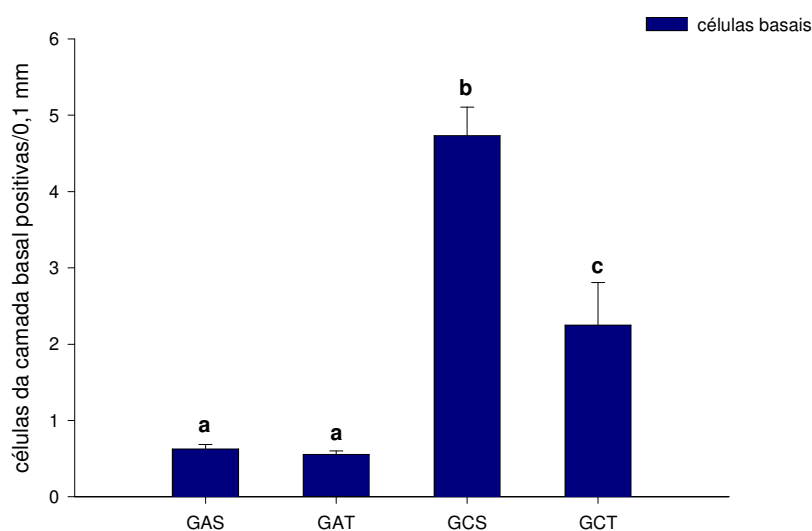


Figura 6 - Representação gráfica dos valores médios (\pm EP) do número de células da camada basal positivas em lâminas primárias do casco de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. Letras distintas denotam diferenças entre os grupos (teste Student-Neuman-Keuls $p \leq 0,05$).

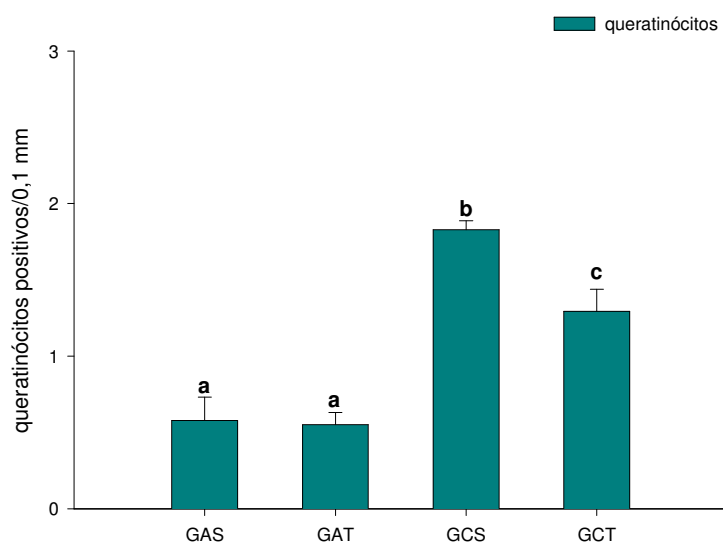


Figura 7 - Representação gráfica dos valores médios (\pm EP) do número de queratinócitos positivos em lâminas primárias do casco de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. Letras distintas denotam diferenças entre os grupos (teste Student-Neuman-Keuls $p \leq 0,05$).

3.4. DISCUSSÃO

A utilização do método de TUNEL mostrou-se eficaz para a identificação de células apoptóticas em tecido laminar de eqüinos. As células da camada basal que reagiram positivamente à coloração de TUNEL também se coraram positivamente para caspase-3, no entanto poucos queratinócitos foram corados positivamente para caspase-3 nos tecidos laminares em todos os animais. Nenhuma célula da camada basal ou mesmo queratinócito dos tecidos dos grupos experimentais apresentaram coloração positiva para caspase-14 corroborando com FALEIROS et al. (2004) em estudo avaliando a apoptose em células epidermais laminar em eqüinos sadios e com laminite (clínica e induzida por sobrecarga de CHO ou extrato de NP).

A apoptose é um achado muito comum em células epiteliais da mucosa intestinal para controlar a eliminação de células mortas na renovação celular (TERAKI & SHIOHARA, 1999; TARNAWSKI & SZABO, 2001). Uma vez que o casco eqüino está em constante crescimento, supõe-se que a renovação celular também ocorra na interface entre as células basais e a membrana basal. Esta interface está em constante modificação para permitir o crescimento do casco da banda coronária em direção ao solo (STUMP, 1967) existindo, possivelmente, o envolvimento da apoptose de células da camada basal neste processo. Suporta essa hipótese os achados de células da epiteliais em apoptose tanto nos animais com laminite induzida por sobrecarga de CHO quanto em animais saudáveis.

Sabe-se que na laminite aguda, em eqüinos, ocorre perda da integridade entre as células da camada basal e a membrana basal causando colapso da estrutura laminar, possivelmente por meio do mecanismo de apoptose celular (FALEIROS et al., 2004). Neste particular, FALEIROS et al. (2004) consideraram que o aumento da apoptose das células da camada basal na laminite aguda deva ser esperado devido a componentes bacterianos liberados durante o desenvolvimento da doença, que são capazes de induzir apoptose em diferentes tipos celulares. MUNGALL et al. (2001) demonstraram que a termolisina e a exotoxina pirogênica estreptocócica B induziu a separação do tecido laminar eqüino. Experimentalmente, a exotoxina pirogênica estreptocócica B pode induzir diretamente apoptose em monócitos (KUO et al., 1999), mas não é capaz de induzir apoptose em células epiteliais de humanos (TAI et al.,

1998). Por outro lado, a ativação tanto da MMP-2 quanto da MMP-9 pela exotoxina pirogênica estreptocócica B induz a apoptose em monócitos humanos (TAMURA et al., 2004).

Nos últimos anos muitas pesquisas têm demonstrado que as MMP possuem um papel importante no desenvolvimento da laminite, sendo que a expressão e ativação das MMP-2 e MMP-9 tem sido descrita em tecido laminar de eqüinos acometidos pela laminite (JONHSON et al., 1998; MUNGALL et al., 1998; KIAW et al., 2004; LOFTUS et al.; 2006). Acredita-se que a ativação dessas enzimas esteja associada a absorção de componentes endotóxicos liberados pela microflora intestinal devido à proliferação de bactérias Gram-positivas (MUNGALL et al., 2001; MUNGALL & POLLITTI, 2002). Neste sentido, foi demonstrado que a administração de inibidores das MMP foram capazes de proteger células hepáticas humanas (YANG et al., 2002) e células do fígado e cérebro de camundongos (GU et al., 2002) do processo apoptótico.

Segundo estudo realizado por VU et al. (1998), as enzimas MMP-2 e MMP-9 são capazes de aumentar a apoptose celular durante o remodelamento tecidual e a neoangiogênese. A diminuição da expressão da MMP-9, disparada por diferentes estímulos apoptóticos, pode reduzir significativamente o potencial invasivo das células leucêmicas (GAZZANELLI, et al. 2000).

Diversos mecanismos biomoleculares e produtos genéticos coexistem nas células, obscurecendo a fronteira entre seu “programa” de vida e de morte. Uma nova hipótese tem sido proposta para o papel da MMP-2 e da MMP-9 no processo nuclear (KWAN et al, 2004). Essas enzimas são tradicionalmente reconhecidas por sua função em clivar tanto as proteínas da matriz extracelular quanto moléculas bioativas intracelulares (MANNELLO et al., 2005). Recentemente, pesquisadores descobriram um novo e inesperado número de substratos e dessa forma novas funções biológicas para as MMP (McCawley & Matrisian, 2001). A participação das MMPs no núcleo celular por meio da habilidade dessas enzimas em clivar a proteína da matriz nuclear polimerase poly-ADP-ribose (PARP), uma enzima reparadora de DNA, dependente de ATP (Scovassi & Diederich, 2004), sugere que as MMP podem inativar a PARP de maneira tempo-dependente similarmente à caspase -3, desempenhando uma função protetora quando a PARP está excessivamente ativada ou, um efeito detrimental, por

impedir o reparo da fita de DNA rompida (KWAN et al., 2004). Estudo *in vitro* demonstrou que a MMP-2 pode associar-se com a cromatina condensada e clivar a PARP (MANNELLO et al., 2005). Dessa forma, a presença de MMP-2 e MMP-9 no núcleo celular, com sua potencial capacidade de clivar também as proteínas da matriz celular (PARS), sugerem que essas enzimas possam atuar da mesma maneira que as caspases do núcleo (SOLDANI & SCOVASSI, 2002), dando novos indícios para a compreensão do papel das MMP no complexo mecanismo da apoptose.

Todas essas afirmativas correlacionam-se com os achados do estudo em tela, uma vez que foi demonstrado o aumento do número de células apoptóticas laminares na laminite induzida por sobrecarga de CHO, juntamente com aumento no nível de expressão gênica das MMP-2 e MMP-9 (ver capítulo 4). Reforçando ainda mais a hipótese do papel das MMP no processo apoptótico observou-se, no grupo exposto à sobrecarga de CHO tratado com solução tampão, diminuição da expressão da MMP-9 comparada ao grupo não tratado e inibição do aumento da expressão da MMP-2. Da mesma maneira, o número de células apoptóticas desse grupo mostrou-se diminuído comparado ao grupo com laminite não-tratado, mesmo tendo apresentado valores maiores em relação ao grupo controle (GAS), apontando para uma possível participação efetiva das MMP na cascata apoptótica em tecido laminar de eqüinos acometidos por laminite.

Por outro lado, reforçando o papel do aumento das células apoptóticas na laminite existem informações na literatura, que as poliaminas putrescina, espermidina e espermina formadas e estocadas em praticamente todas as células estão envolvidas no processo de proliferação celular e manutenção da viabilidade celular (COHEN, 1998). Portanto, pode-se pensar que alterações no metabolismo das poliaminas possam interferir na função normal da célula e conseqüentemente causar sua morte (SEILER & RAUL, 2005). Na última década, interrelações entre o metabolismo das poliaminas e a morte celular têm sido bastante discutidas. Diversas evidências indicam que existe uma ligação estreita entre as poliaminas e o processo de apoptose celular (SCHIPPER et al., 2000; PIGNATTI et al., 2004).

Neste sentido, o aumento do número de células epidermais apoptóticas em tecido laminar dos eqüinos com laminite experimental, possa ser explicado pelo

aumento nas concentrações de putrescina em conteúdo cecal de eqüinos como demonstrado no capítulo 5. A alteração da permeabilidade da mucosa cecal causada pela diminuição do pH e pela ação de endotoxinas (WEISS et al., 2000), permite a permeação sistêmica de diferentes substâncias entre elas, poliaminas produzidas pelas bactérias Gram-positivas por meio da descarboxilação do amido em excesso. Chegando até o tecido laminar elas poderiam ativar mecanismos celulares que disparam a cascata apoptótica.

De outra forma, considerando a teoria vascular sobre a patogênese da laminite, FALEIROS et al. (2004) observaram que o aumento no número de células apoptóticas da camada basal em eqüinos com laminite comparados com eqüinos sadios poderia ser explicado por um evento isquêmico. Em diversas espécies, o processo de apoptose é considerado um importante mecanismo de morte celular após injúrias de isquemia e reperfusão sendo que na maior parte dos modelos experimentais, a apoptose tem sido detectada principalmente durante o período de reperfusão (GOTTLIEB et al., 1994; FLISS & GATTINGER, 1996; OLIVETTI et al., 1997; YUE et al., 1997; KOHLI et al., 1999). As espécies reativas de oxigênio encontram-se aumentados durante a reperfusão podendo estar envolvidos na indução da apoptose em diversos tipos celulares (KOHLI et al., 1999). Diversos modelos experimentais de injúria por isquemia e reperfusão no fígado têm demonstrado efeito protetor dos inibidores de MMP, em termos de necrose celular, apoptose e rearranjo da matriz extracelular. (VIAPPIANI et al., 2006). Neste sentido, a ativação das MMP em tecido laminar de eqüinos com laminite poderia ocorrer como resultado de evento isquêmico que deflagaria a cascata apoptótica (FALEIROS et al., 2004).

Comparando os dados aqui apresentados com aqueles demonstrados por FALEIROS et al. (2004), observa-se, contrariamente, que houve aumento no número de células epidermais positivas para a coloração de TUNEL nos cavalos submetidos a sobrecarga de CHO para indução da laminite. Essa diferença nos resultados pode ser explicada pelo diferença nos momentos em que os cavalos foram sacrificados para coleta do tecido laminar, ou seja 48 horas após a sobrecarga contra 10 a 18 horas após a sobrecarga desses autores que sugerem ter sido o número pequeno de células apoptóticas detectado no grupo exposto à sobrecarga de CHO, devido ao intervalo de

tempo insuficiente entre a administração e o desenvolvimento de fragmentação de DNA detectável. De fato, GOTTLIEB et al. (1994) demonstraram que o aumento no número de células positivas à coloração de TUNEL ocorreu somente após uma hora de reperfusão mas que esse aumento só foi significativo após 24 e 72 horas de reperfusão.

Quanto à distribuição das células apoptóticas no tecido laminar, os resultados obtidos foram consonantes com aqueles observados por FALEIROS et al. (2004).

A técnica de imuno-histoquímica para caspase-3 e caspase-14 assegura a diferenciação de células em processo de apoptose segundo FALEIROS et al. (2004). Essa técnica se baseia no conhecimento de que queratinócitos humanos, em processo de diferenciação terminal, expressam caspase-14 enquanto células apoptóticas expressam caspase-3 e caspase-14 (HATHAWAY & KUECLHE, 2002; GANDARILLAS, 2000). Dessa maneira, foi evidenciado o aumento do número de células da camada basal coradas tanto com a técnica de TÚNEL quanto com a técnica de imuno-histoquímica em cavalos com laminite experimental induzida por sobrecarga de CHO.

Os queratinócitos epidermais se coraram positivamente para a técnica de TÚNEL, no entanto não responderam da mesma maneira à coloração pela imuno-histoquímica corroborando com FALEIROS et al. (2004). Segundo esses autores a explicação mais plausível para esse fato, seria a ausência de ativação da caspase nesses tipos celulares, uma vez que a fragmentação do DNA pode ocorrer independentemente da ativação pela caspase (ADAMS & CORY, 1998), podendo ser que esses queratinócitos estejam morrendo devido a um processo independente da caspase sendo ele necrose (GOWN & WILLINGHAM, 2002) ou outro processo ainda não definido (LOCKSHIN & ZAKERI, 2002).

O número de células basais foi quatro e seis vezes maiores nos grupos GCT e GCS, respectivamente; o número de queratinócitos foi duas vezes maior em ambos os grupos, em relação ao GAS. O número elevado de células apoptóticas da camada basal detectadas no tecido laminar de eqüinos com laminite sugere que a apoptose participa das lesões laminares. O número elevado de queratinócitos detectados na interface das lâminas epidérmicas primárias e secundárias em eqüinos com laminite necessita ser esclarecido

3.5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo:

1. O número elevado de células apoptóticas da camada basal e queratinócitos detectado no tecido lamelar de cavalos com laminite sugere que a apoptose participa das lesões dessa afecção.

2. O tratamento com solução tampão administrada por via intracecal diminuiu o número de células epidermais apoptóticas (células da camada basal e queratinócitos) em cavalos com laminite induzida por sobrecarga de CHO, embora não tenha inibido completamente seu aumento.

3. As células da camada basal estão localizadas nas lâminas epidérmicas secundárias e os queratinócitos na margem dos eixos queratinizados das lâminas primárias.

4. A distribuição das células apoptóticas no terço apical, medial e basal da lâmina primária não apresenta diferença em tecido laminar de eqüinos sados ou aqueles com laminite por sobrecarga de CHO.

3.6. REFERÊNCIAS¹³

ADAIR, H.S. et al. Laminar microvascular flow, measured by means of laser Doppler flowmetry, during the prodromal stages of black walnut-induced laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.862-868, 2000.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Sci.* v.281, n.5381, p.1322-1326, 1998.

AL-ZI'ABI, M.O.; FRASER, H.M.; WATSON, E.D. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. *Reproduction*, v.123, n.1, p.67-77, 2002.

ARCHAMBAULT, D.; ST-LAURENT, G. Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection. *Virus Genes*, v.20, n.2, p.143-147, 2000.

BANTEL, H.; BRUNING, T.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Activation of caspases by death receptors. *Eur. Cytokine Netw.*, v.9, n.4, p.681-684, 1998.

BENDALI-AHCENE, S. et al. Anti-alpha chain monoclonal antibodies of equine MHC class-II antigens: applications to equine infectious anaemia. *Res. Vet. Sci.*, v.62, n.2, p.99-104, 1997.

BOCCCELLINO, M. et al. Apoptosis induced by interferon-alpha and antagonized by EGF is regulated by caspase-3-mediated cleavage of gelsolin in human epidermoid cancer cells. *Cell Physiol*, v.201, n.1, p.71-83, 2004.

BOFFI, F.M. et al. Training-induced apoptosis in skeletal muscle. *Equine Vet. J. Suppl.*, v.34, p.275-278, 2002.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying. *Biochemistry*, v.70, n.2, p.231-239, 2005.

¹³ De acordo com as normas da ABNT NBB 6023, agosto de 2002

CLARKE, P.G.H. Developmental cell death: morphological and multiples mechanisms. *Anat. Embryol.*, v.181, p.195-213, 1990.

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

COHEN, S.S. A guide to the polyamines. Oxford University Press, *Curr. Pharm. Des.*, v.12, n.23, p.2923-2934, 1998.

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

DELL'AQUILA, M.E. et al. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis. *Biol. Reprod.*, v.68, n.6, p.2065-2072, 2003.

ENARI, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, v.391, p.43–50, 1998.

FADOK, V.A.; HENSON, P.M. Getting rid of the bodies. *Curr. Biol.*, v.8, n.19, p.R693-695, 1998.

FALEIROS, R.R. et al. Assessment of apoptosis in epidermal lamellar cells in clinically normal horses and those with laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.65, n.5, p.578-585, 2004.

FLISS H, GATTINGER D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ. Res.*, v.79, n.5, p.949-956, 1996.

GANDARILLAS, A. Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp. Gerontol.*, v.35, n.1, p.53-62, 2000.

GARNER, H.E. et al. Lactic acidosis: a factor associated with equine laminitis. *J. Anim. Sci.*, v.45, p.1037-1041, 1977.

GARNER, H.E. et al. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet. J.*, v.10, p.249-252, 1978.

GAZZANELLI, G. et al. Matrix metalloproteinases expression in HL-60 promyelocytic leukemia cells during apoptosis. *Apoptosis*, v.5, n.2, p.165-172, 2000.

GOTTLIEB, R.A. et al. Related Articles, Links Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.*, v.94, n.4, p.1621-1628, 1994.

GOWN, A.M.; WILLINGHAM, M.C.J. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase. *Histochem Cytochem*, v.50, n.4, p.449-454, 2002.

GU, Z. et al. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: Signalling pathway to neuronal cell death. *Sci.*, v.297, p.1186–1190, 2002.

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

HENSON, F.M. et al. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine Vet. J.* v.29, n.6, p.441-447, 1997.

HOOD, D.M. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v.15, p.321-343, 1999.

HORVITZ, H.R. Worms, life, and death (NOBEL lecture). *ChemBiochem*. v.4, n.8, p.697-711, 2003.

HUNT, R.J. The pathophysiology of acute laminitis. *Compend Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.13, p.1003-1010, 1991.

JOHNSON, P.J. et al. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. *Vet. Record*, v.142, n.15, p.392-396, 1998.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, v.26, n.4, p.239-257, 1972.

- KOHLI, V. et al. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*, v.67, n.8, p.1099-1105, 1999.
- KUO, C.F. et al. Streptococcal pyrogenic exotoxin B induces apoptosis and reduces phagocytic activity in U937 cells. *Infect Immun.*, v.67, n.1, p.126-130, 1999.
- KWAN, J.A. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) *in vitro*. *FASEB J.* v.18, p.690–692, 2004.
- KYAW, L.; TANNER, M.; POLLITT, C. C. Equine laminitis: increased transcription of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) occurs during the developmental phase. *Equine Vet. J.*, v.36, n.3, p.221-225, 2004.
- LIN, C. et al. Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. *Vet. Microbiol.*, v.84, n.4, p.357-365, 2002.
- LIN, C. et al. Cultures of equine respiratory epithelial cells and organ explants as tools for the study of equine influenza virus infection. *Arch. Virol.*, v.146, n.11, p.2239-2247, 2001.
- LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. Caspase-independent cell deaths. *Curr. Opin Cell Biol.*, v.14, n.6, p.727-733, 2002.
- LOFTUS, J.P.; BELKNAP, J.K.; BLACK, S.J. Matrix metalloproteinase-9 in laminae of black walnut extract treated horses correlates with neutrophil abundance. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.113, n.3-4, p.267-276, 2006.
- MCCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore! *Curr. Opin Cell Biol.*, v.13, p.534–540, 2001.
- MEAGHER, L.C. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B₂. *J. Leukoc. Biol.*, v.52, n.3, p.269-273, 1992.

MOORE, J.N. et al. Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis: a preliminary report. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.722-723, 1979.

MUNGALL, B. A.; POLLITT, C. C. Thermolysin activates equine lamellar hoof matrix metalloproteinases. *J. Comp. Pathol.*, v.126, n.1, p.9-16, 2002.

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

MUNGALL, B.A.; POLLITT, C.C.; COLLINS, R. Localization of gelatinase activity in epidermal hoof lamellae by in situ zymography. *Histochem. Cell Biol.*, v.110, n.5, p.535-540, 1998.

OLIVETTI, G. et al. Apoptosis in the failing human heart. *N. Engl. J. Med.*, v.336, n.16, p.1131-1141, 1997.

PARTON, M.; DOWSETT, M.; SMITH, I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ*. v.322, n.7301, p.1528-1532, 2001.

PEDERSEN, H.G.; WATSON, E.D., TELFER, E.E. Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of DNA fragmentation. *Reproduction*, v.125, n.3, p.417-423, 2003.

PHILCHENKOV, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J. Cell Mol. Med.*, v.8, n.4, p.432-444, 2004.

PIGNATTI, C. et al. Signal transduction pathways linking polyamines to apoptosis. *Amino Acids*, v.27, p.359-65, 2004.

POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v.28, p.38-46, 1996.

POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract*, v.45, p.188-192, 1999.

ROELS, S. et al. Proliferation, DNA ploidy, p53 overexpression and nuclear DNA fragmentation in six equine melanocytic tumours. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, v.47, n.7, 439-448, 2000.

ROWE, E.L. et al. Detection of apoptotic cells in intestines from horses with and without gastrointestinal tract disease. *Am. J. Vet. Res.*, v.64, n.8, p.982-988, 2003.

SCOVASSI, I.; DIEDERICH, M. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem. Pharmacol.*, v.68, p.1041–1047, 2004.

SCHIPPER, R.G.; PENNING, L.S.; VERHOFSTAD, A.J. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: Effectors or protectors? *Semin. Cancer Biol.*, v.10, p.55–68, 2000.

SEILER, N.; RAUL, F. Polyamines and apoptosis *J Cell Mol Med.* v.9, n.3, p.623-642, 2005

SLATER, M.R.; HOOD, D.M.; CARTER, G.K. Descriptive epidemiological study of equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v.27, p.364-367, 1995.

SOLDANI, C.; SCOVASSI, A.I. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis*, v.7, p.321–328, 2002.

STUMP, J.E. Anatomy of the normal equine foot, including microscopic features of the laminar region. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.151, n.12, p.1588-1598, 1967.

TAMURA, F. et al. Related Articles, Links Proapoptotic effect of proteolytic activation of matrix metalloproteinases by *Streptococcus pyogenes* thiol proteinase (*Streptococcus pyrogenes* exotoxin B). *Infect. Immun.*, v.72, n.8, p.4836-47, 2004.

TARNAWSKI, A.S.; SZABO, I. Apoptosis-programmed cell death and its relevance to gastrointestinal epithelium: survival signal from the matrix. *Gastroenterology*, v.120, n.1, p.294-299, 2001.

TERAKI, Y.; SHIOHARA, T. Apoptosis and skin. *Eur. J. Dermatol.*, v.9, n.5, p.413-425, 1999.

TSAI, P.J. et al. Group A Streptococcus induces apoptosis in human epithelial cells. *Infect. Immun.*, v.67, n.9, p.4334-4339, 1999.

VIAPPIANI, S.; SARIAHMETOGLU, M.; SCHULZ, R. The Role of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Ischemia-Reperfusion Injury in the Liver. *Current Pharmaceutical Design*, v.12, n.23, p.2923-2934, 2006.

WEINBERG, S.L. Apoptosis: the good and the bad--possible future therapeutic implications. *Clin. Cardiol.* v.22, n.6, p.383-384, 1999.

WEISS, D.J. et al. In vitro evaluation of intramural arch endothelial cells and hoof keratinocytes. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.858-861, 2000.

YANG, H. et al. Prostaglandin E(1) protects human liver sinusoidal endothelial cell from apoptosis induced by hypoxia reoxygenation. *Microvasc. Res.*, v.64, n.1, p.94-103, 2002.

YUE, T.L. et al. 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: possible role for stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas expression. *Mol. Pharmacol.*, v.51, n.6, p.951-956, 1997.

CAPÍTULO 4 - TRANSCRIÇÃO DAS ENZIMAS METALOPROTEINASE-2 E -9 (MMP-2 E MMP-9) EM EQÜINOS COM LAMINITE INDUZIDA POR SOBRECARGA DE CHO, TRATADOS OU NÃO COM SOLUÇÃO TAMPÃO.

RESUMO - A degradação da membrana basal laminar pelas MMPs representa um evento crítico na fisiopatologia da laminite eqüina. Neste estudo comparou-se a expressão gênica da MMP-2 e MMP-9 durante o desenvolvimento clínico da laminite induzida por sobrecarga de CHO após a administração intracecal de solução salina ou tampão. Os eqüinos foram distribuídos aleatoriamente entre quatro grupos de tratamento: controle (GAS, n=3); controle tampão (GAT, n=5); controle CHO (GCS, n=5); CHO-tampão (GCT, n=4). A solução tampão foi administrada 8 h após a indução da laminite. As amostras de tecido laminar foram coletadas 48 horas após a indução da laminite ou administração de solução salina, imediatamente após a eutanásia. A quantificação do mRNA da MMP-2 e MMP-9 foi realizada por método de RT-PCR. Os valores obtidos para as MMPs foram normalizados contra os valores da β -actina e as diferenças do mRNA foram comparadas utilizando-se o método comparativo de CT ($\Delta\Delta C_T$). A expressão gênica da MMP-2 e MMP-9 foi maior nos tecidos dos animais com laminite (GCT, GCS) do que em animais normais (GAT, GAS). A expressão da MMP-2 nos grupos GCS, GCT foi, respectivamente, 2,25 e 1,18 maior que no grupo GAS. A expressão da MMP-9 nos grupos GCS e GCT foi, respectivamente, 17,79 e 5,06 vezes maior que no grupo GAS. Concluiu-se que após a administração intracecal de solução tampão no GCT, apesar do aumento na expressão gênica da MMP-2 e MMP-9 não ter sido completamente bloqueado, a expressão de ambas as MMPs apresentou-se reduzida quando comparada ao grupo exposto a sobrecarga de CHO e sem tratamento (GCS).

Palavras-chave: laminite, metaloproteinase, eqüino.

TRANSCRIPTION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 AND -9 (MMP-2 AND MMP-9) IN CLINICALLY NORMAL HORSES AND THOSE WITH CARBOHYDRATE-OVERLOAD INDUCED LAMINITIS TREATED OR NOT WITH BUFFERING SOLUTION.

SUMMARY - Degradation of the lamellar basement membrane by matrix metalloproteinase enzymes (MMP) represents a critical early event in the pathogenesis of equine laminitis. Under normal physiological states, controlled dissolution allows the growth of the hoof. However, when excessive activation of these enzymes occurs, it leads to separation of the epidermic from the dermic laminae. This study compared the gene expression of MMP-2 and MMP-9 during clinical development of CHO-induced laminitis when saline or buffer solution was administered intracecally. Horses were randomly divided among four treatment groups: control (WS); buffer control (WB); CHO-induced laminitis (CS); and CHO-induced laminitis with buffer treatment (CB). The buffer was administered 8 hours after CHO. Tissues were collected 48 hours after CHO, immediately after euthanasia. The quantification of MMP-2 and MMP-9 mRNA was made by RT-PCR. Values obtained for MMPs were normalized against the β -actin values and mRNA fold differences were compared to it using a $\Delta\Delta C_T$ method. Expression of MMP-2 and MMP-9 was greater in laminitic tissues (CB, CS) than in non-laminitic tissues (WB, WS). MMP-2 expression in the CS and CB group was 2.25-fold, 1.18-fold greater than WS group, respectively. WB group represented 0.32-fold the MMP-2 expression of the WS group. MMP-9 expression in the CS and CB group was up 17.79-fold and 5.06-fold higher than WS group, respectively. WB group represented 0.72-fold the MMP-9 expression of the WS group. We concluded that intracecal administration of buffer solution may be useful in the management of horses fed high levels of carbohydrate. Even though the increased MMP-2 and MMP-9 gene expression were not completely prevented by administration of the buffer solution, the expression of both MMPs was decreased compared with controls receiving only saline after CHO. Further studies may elucidate the therapeutic potential of this buffer treatment in the prevention of naturally-acquired carbohydrate-related laminitis.

Key words: laminitis, metalloproteinase, horse.

4.1. INTRODUÇÃO

A laminite aguda é uma doença em que os sintomas clínicos tornam-se aparentes somente após os tecidos laminares terem sido expostos às alterações sistêmicas que induzem mudanças metabólicas, inflamatórias e degenerativas, responsáveis pela falência estrutural das interdigitações da lâmina dérmica e epidérmica dentro da cápsula do casco (HOOD et al., 1993).

A fase aguda da laminite é caracterizada por desintegração da membrana basal, associada às mudanças morfológicas nas células epiteliais basais da lâmina secundária epidérmica (POLLITT, 1996). As lamininas e os colágenos dos tipos IV e VII são componentes estruturais chaves da membrana basal (POLLITT, 1994) e são alvos conhecidos das enzimas MMP-2 e MMP-9, que parecem dissolver essas substâncias (NAGASE & WOESSNER et al., 1999; FRENCH & POLLITT, 2004).

As MMPs constituem uma família de proteinases zinco-dependentes envolvidas na degradação fisiológica e mórbida da matriz extracelular e de componentes da membrana basal que se fixam às células basais epidérmicas (WOESSNER, 1991; BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). Em condições fisiológicas, a dissolução controlada permite o movimento da lâmina epidérmica através da lâmina dérmica conforme ocorre o crescimento do casco (POLLITT & DARADKA, 1998; POLLITT, 1999). Acredita-se que a ativação excessiva dessas enzimas seja responsável pelo início da cascata de eventos que leva à dissolução descontrolada de componentes da membrana basal e, mais tardiamente, à separação entre as lâminas epidérmica e dérmica (POLLITT, 1996; POLLITT & DARADKA, 1998).

Estudos *in vitro* com tecido laminar digital enfocando as mudanças na ultraestrutura e a biologia molecular básica da laminite apontam para o aumento da atividade da MMP durante o desenvolvimento da laminite clínica (MUNGALL et al., 2001; MUNGALL & POLLITT, 2002; FRENCH & POLLITT, 2004). De maneira inversa à hipoperfusão defendida pela teoria vascular, o aumento do fluxo digital durante os estágios prodrômicos da laminite seria responsável pela chegada de fatores disparadores tóxicos ao epitélio digital, resultando em atividade desregulada das MMP. Esta atividade desregulada resultaria em destruição da estrutura da membrana basal

epidérmica causando, eventualmente, separação da epiderme e da derme e com isso, a perda da estrutura de ligação entre a falange distal e a muralha do casco.

Foram realizados ensaios *in vitro* testando a ativação das MMP e sua relação com danos à membrana basal no desenvolvimento da laminite utilizando vários agentes comumente associados com esta afecção, incluindo eicosanóides, citocinas, endotoxinas e fragmentos de bactérias intestinais Gram-positivas. Somente os fragmentos induziram a ativação *in vitro* das MMP (MUNGALL et al., 2001), de maneira similar aos resultados obtidos em pesquisas com tecido digital *in vitro*. Em outros estudos, demonstrou-se que a termolisina de origem bacteriana medeia a separação do casco por meio da ativação das MMP (MUNGALL & POLLITT, 2002). Baseados nestas informações, muitos pesquisadores defendem que a proliferação de bactérias Gram-positivas no intestino grosso de eqüinos pode ser a fonte dos fatores circulatórios envolvidos na indução da laminite (MUNGALL et al., 2001). Dessa maneira, a degradação da membrana basal por MMP representaria o evento precoce crucial na fisiopatologia da laminite eqüina.

Muitos estudos têm demonstrado que as exotoxinas de bactérias Gram-positivas, as quais são constituintes da microflora intestinal normal, responsáveis pela fermentação do amido no intestino grosso de eqüinos, possam induzir a ativação das MMP (GARNER et al., 1978; POLLITT, 1999; MUNGALL et al., 2001). GARNER et al. (1977, 1978) observaram que mudanças na população bacteriana do ceco associadas à fermentação do CHO em excesso, resultam em acidose láctica ocasionando a morte da microflora Gram-negativa normal do ceco e crescimento exacerbado e rápido de organismos Gram-positivos, como os *Streptococcus bovis*, com estes últimos tornando-se as bactérias predominantes no intestino grosso.

Outros relatos mostraram que eqüinos podem sobreviver após a sobrecarga de CHO sem desenvolverem laminite uma vez que bactérias do gênero *Streptococcus bovis* tenham sido eliminadas da microflora do intestino grosso por meio da pré-administração do antibiótico virginiamicina (ROWE et al., 1994).

A hipótese aqui estudada foi que a expressão gênica das enzimas MMP-2 e MMP-9 em tecido laminar do casco em equinos submetidos à sobrecarga de CHO poderia ser alterada pela administração de solução tampão por via intracecal. O

objetivo deste estudo foi comparar a expressão gênica de MMP-2 e MMP-9, por meio de técnica de RT-PCR em tempo real em eqüinos clinicamente saudáveis e naqueles com laminite induzida por sobrecarga de CHO quando uma solução tampão composta de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ou solução salina é administrada por via intracecal.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Amostras

As amostras de tecido laminar foram coletadas de 17 eqüinos, oito machos castrados e 11 fêmeas não-gestantes, sem raça definida, adultos, hípidos, com idades variando de três a nove anos, pesando entre 200 e 410 kg e com escore corporal de três a quatro, segundo SPEIRS (1997). Esses animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: controle (GAS, n=3); controle tampão (GAT, n=5); controle CHO (GCS, n=5); CHO-tampão (GCT, n=4), conforme descrito no capítulo 2.

Após um período experimental de 48 horas, os animais foram sacrificados por meio da administração de EGG (120 mg/kg) seguida da infusão rápida de tiopental sódico¹ (20mg/kg) e solução saturada de cloreto de potássio, todos por via intravenosa. Procedeu-se a separação dos cascos por desarticulação metacarpofalangeana. Os cascos foram seccionados com fita de serra, de acordo com protocolo descrito previamente por POLLITT (1996). Obtiveram-se fragmentos retangulares da muralha interna, com lados medindo 1,0 x 0,5 cm e espessura de 0,1 cm, contendo a interface entre as lâminas dérmicas e epidérmicas que foram imediatamente congelados em criotubos por meio de imersão em nitrogênio líquido e subseqüentemente, armazenados em freezer -70°C.

4.2.2. Extração e Tratamento do RNA

O protocolo utilizado foi descrito por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) constando das etapas descritas a seguir:

a) Homogeneização: as amostras de tecido laminar foram descongeladas, transferidas para tubos de polipropileno livres de RNA e maceradas em Tri-Reagent®² (350 µL do reagente/100 mg de tecido) com auxílio de gral e pistilo, sendo em seguida homogeneizadas para facilitar a inibição imediata e efetiva da atividade da enzima RNase. Este procedimento causou ruptura celular e liberação do conteúdo intracelular para o meio. O Tri-Reagent® é uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que mantém a integridade do RNA durante a lise celular.

¹ Tiopentax – Cristália, Campinas – SP.

² TRI® Reagent RNA Isolation Reagent, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

b) Separação das fases: em seguida, adicionou-se clorofórmio³ na proporção de 100 µL para cada 350 µL de Tri-Reagent®, agitando-se a amostra vigorosamente por 15 segundos e incubando em temperatura ambiente (20-22 °C) por 10 minutos. Após centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C, a suspensão apresentou-se separada em três fases: uma inferior, de fenol-clorofórmio e de coloração rosada, contendo DNA, denominada fase orgânica; uma interfase branca contendo proteínas; e uma fase superior, aquosa e incolor, com cerca de dois terços do volume total, contendo RNA.

c) Precipitação do RNA: a fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde adicionou-se 250 µL de isopropanol⁴ e incubou-se a solução por um período de 24 horas em uma temperatura de -20 °C. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 20 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante, recuperando-se o precipitado de RNA como um gel esbranquiçado semitransparente (sedimento).

d) Lavagem do RNA precipitado: ressuspendeu-se o sedimento de RNA em 1 mL de etanol 80% para cada 350 µL de Tri-Reagent®, e centrifugou-se a 10.000 g por 8 minutos a 4 °C. Em seguida, o etanol foi descartado e o sedimento foi submetido à secagem em equipamento de evaporação centrífuga⁵ durante 5 minutos.

e) Eluição e quantificação do RNA: O sedimento foi eluído em 60 µL de água DEPC⁶ (solução aquosa de dietil pirocarbonato de sódio 0,1%) e aquecido a 65 °C durante 10 minutos para ressuspender o RNA. O RNA foi quantificado com auxílio de espectrofotômetro a laser⁷. A pureza da amostra em solução foi verificada pela razão das absorvâncias em 260/280 nm. Amostras cuja razão de absorvância em 260/280 nm fosse inferior a 1,7, apresentavam grande contaminação por proteínas e eram descartadas. A concentração de RNA foi quantificada pela sua absorvância em 260 nm de acordo com a relação:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 0,8 \times \text{FD}$$

³ Merck GmbH, Darmstadt – Alemanha.

⁴ Sigma-Aldrich, Steinheim – Alemanha.

⁵ SC 110A Savant Speed Vac® Concentrator Systems, Philadelphia, PA - EUA.

⁶ Water RNase-Free DEPC Treated, USB Corp, Cleveland, Ohio - EUA.

⁷ MultiSpec-1501, Shimadzu Corporation, Kyoto - Japão.

Onde,

[RNA] = concentração de RNA ($\mu\text{g/ml}$)

A260 = Absorbância (em densidade óptica) em 260 nm

0,8: fator de conversão (uma unidade de densidade óptica $\approx 40 \mu\text{g/mL RNA}$, no entanto, este resultado mostra valores de RNA muito mais altos do que de fato existe. Por isso multiplica-se por 0,8)

FD = fator de diluição utilizado (normalmente 1:30)

f) Verificação da integridade do RNA por eletroforese: após extração e quantificação do RNA total obtido do tecido laminar, a integridade do mesmo foi avaliada. Amostras de 1000 ng de RNA total foram transferidas para tubos de polipropileno livres de RNA e acrescidas de 5 μL de solução⁸ contendo:

- 95% formamida;
- 0,025% SDS;
- 0,025% azul de bromofenol (corante usado para posterior visualização das bandas eletroforéticas);
- 0,025% xileno cianol FF;
- 0,025% brometo de etídeo;
- 0,5 mM EDTA.

As amostras foram aplicadas sobre gel de agarose 1%, preparado em solução tampão TAE 1x (Tris 40 mM-Ácido Acético 20 mM, EDTA 1 mM)⁹ com pH 8,0, acrescido de 1 μL de brometo de etídeo¹⁰ para cada 100 mL de agarose permitindo a visualização das bandas. Durante a eletroforese, o gel permaneceu imerso em tampão TAE 1x durante aplicação de um potencial de 80 V (36 mA) por 30 minutos, em cuba para eletroforese¹¹ para permitir a migração das cadeias de RNA, de acordo com sua massa. A integridade do RNA foi confirmada pela definição das bandas e ausência de rastros no gel. Somente as amostras de RNA que se mostraram íntegras foram utilizadas como substrato para a transcrição reversa.

⁸ 2X RNA Loading Dye, Fermentas INC., Hanover, MD – EUA.

⁹ Bio-Rad, Hercules, CA - EUA.

¹⁰ Bio-Rad, Hercules, CA - EUA.

¹¹ Bio-Rad, Hercules, CA - EUA.

Ao final do processo, o gel apresentou bandas formadas pela deposição de diferentes espécies de RNA. No primeiro poço de cada gel aplicou-se uma escala padrão de pesos moleculares¹², para posterior identificação das bandas das amostras. A imagem do gel com suas bandas eletroforéticas foi capturada por um sistema de documentação de géis composto por um transiluminador de luz ultravioleta (UV)¹³, uma câmara escura e uma câmera digital¹⁴ acoplada a um microcomputador, carregado com sistema de foto-documentação¹⁵.

g) Purificação das amostras de RNA: após se verificar a integridade do RNA das amostras, procedeu-se o tratamento destas com a enzima deoxirribonuclease I para a eliminação do DNA das amostras de RNA antes da amplificação. Para isso utilizou-se tubos de polipropileno livres de RNase mantidos em gelo, onde adicionou-se:

- 1,2 µg da amostra de RNA;
- 1,2 µL de “DNase I Amplification Grade” (1 U/µL)¹⁶;
- 1,2 µL de “DNase Reaction Buffer” (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl);
- água DEPC¹⁷ até o volume de 12 µL.

Os tubos foram incubados em temperatura ambiente (20-22 °C) durante 15 min. Após esse período a DNase foi inativada por meio da adição de 1,2 µL de solução contendo EDTA (25 Mm). As amostras foram então aquecidas durante 10 minutos a 65° C. Após este processo a amostra foi considerada pronta para ser submetida ao processo de transcrição reversa.

4.2.3. Transcrição Reversa do mRNA

As amostras de mRNA obtidas pelo protocolo anteriormente descrito foram submetidas à transcrição reversa pela ação da enzima transcriptase reversa. O meio de reação consistiu de:

- 1,2 µg da amostra de RNA descontaminado;

¹² RNA Mass Ladder, Invitrogen Corp, NY - EUA.

¹³ Bio-Rad, Hercules, CA - EUA.

¹⁴ DC-290, Eastman Kodak Co., Rochester, NY - EUA.

¹⁵ AlphaDigiDoc Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA - EUA.

¹⁶ Invitrogen Corp, NY - EUA.

¹⁷ Ultrapure water RNase free DEPC treated, USB Corp, Ohio - EUA.

- 35 µL de água DEPC

A solução foi incubada em banho seco¹⁸ a 65 °C por 10 minutos para desnaturação do RNA total e imediatamente transferidos para o gelo durante 2 minutos para parar o processo de desnaturação do RNA e prevenir sua degradação. Posteriormente, foram adicionados 45 µL de “cDNA MASTER MIX” constituído de:

- 16 µL de *First Strand Buffer*¹⁹(375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 250 mM Tris-HCl, pH 8,3);
- 4 µL de 10 mM dNTP Mix²⁰ (mistura dos desoxirribonucleotídeos: trifosfato de adenosina (dATP), trifosfato de timidina (dTTP), trifosfato de guanosina (dGTP) e trifosfato de citidina (dCTP));
- 6 µL de 1 X *BSA(Bovine Serum Albumin)*²¹
- 4 µL de *Primer Oligo dT*²²;
- 9 µL de ditioneitol 0,1M (DTT);
- 1,5 µL de inibidor de RNase²³;
- 1,5 µL de água DEPC;
- 4 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV-RT (220 U/ml)²⁴.

As amostras foram cuidadosamente agitadas e incubadas em temperatura ambiente (20-22 °C) por 10 minutos para permitir que o primer se anelasse ao mRNA. Procedeu-se nova incubação a 40 °C por 1 hora para que a transcrição reversa ocorresse. Após a transcrição em cDNA, 40 µL de água DEPC foram adicionados à amostra para diluir o cDNA. Para a criação de cDNA para a curva padrão utilizou-se o mesmo meio de reação descrito acima, no entanto iniciou-se as diluições com 2 µg da amostra de RNA descontaminado, em duplicata.

4.2.4. Quantificação do mRNA pelo Sistema TaqMan®

Os “primers”²⁵ e as sondas²⁶ com oligonucleotídeos gene-específicos foram gerados comercialmente para reconhecer seqüências-alvos de interesse presentes em

¹⁸ Digital Dry Block Heaters, VWR, PA - EUA.

¹⁹ Ambion, Inc, Texas - EUA.

²⁰ Invitrogen Corp, NY - EUA

²¹ New England Biolabs, Ipswich, MA - EUA

²² GeneLab, Baton Rouge, LA - EUA.

²³ RNAsin Invitrogen Corp, NY - EUA.

²⁴ Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT) - Invitrogen Corp, NY - EUA.

²⁵ GeneLab, Baton Rouge, LA - EUA.

moléculas de DNA complementares às moléculas de mRNA que codificam MMP-2, MMP-9 e a β -actina (Tab. 1). As sondas foram identificadas com o repórter “dye 6-FAM”.

O meio de reação de amplificação do cDNA teve a seguinte composição:

- 5 μ L de cDNA;
- 25 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix²⁷;
- 1 μ L do “primer sense” em solução com 20 μ M, em água ultra-purificada;
- 1 μ L do “primer anti-sense” em solução com 20 μ M, em água ultra-purificada;
- 1 μ L da sonda na concentração de 10 pmoles/ μ L;
- 17 μ L de água duplamente deionizada estéril (ddH₂O);

A reação de PCR foi realizada em aparelho termociclador²⁸, que aquece e resfria alternadamente o meio de reação, favorecendo ciclos de amplificação (Fig.1). O perfil de ciclos da PCR constituiu de:

1. Etapa de desnaturação inicial: processo de separação das cadeias que formam a dupla fita de DNA, por meio da elevação da temperatura para aproximadamente 94 °C durante 3 minutos;

2. Repetição de ciclos em séries com cada repetição composta de três etapas:

a) etapa de desnaturação a aproximadamente 94 °C por 1 minuto;

b) etapa de anelamento dos primers com a seqüência-alvo do cDNA a ser amplificada: uma vez separadas as fitas de DNA, a temperatura da reação é reduzida para aproximadamente 60 °C e os “primers” hibridizam-se (anelam-se), um em cada fita, na região dos flancos das respectivas seqüências-alvos;

c) Etapa de alongamento: nesta fase, eleva-se a temperatura para aproximadamente 72 °C durante 2 minutos, para que a enzima Taq-polimerase posicione-se junto aos “primers” anelados à seqüência-alvo e inicie a duplicação da fitas de DNA (fitas-molde), utilizando os nucleotídeos que contêm as bases nitrogenadas complementares àquelas das fitas-molde.

²⁶ GeneLab, Baton Rouge, LA - EUA.

²⁷ Applied Biosystems Foster City, CA - EUA.

²⁸ ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector Applied Biosystems Foster City, CA - EUA.

Após o término de cada ciclo, todo o processo foi repetido, desde a desnaturação até a extensão, por várias vezes (40 vezes em média) para se obter uma quantidade razoável do cDNA amplificado (Fig. 2).

A quantidade de DNA amplificado referente às proteínas de interesse foi normalizada pela quantidade do DNA que codifica a β -actina encontrada no mesmo grupo experimental. A β -actina é um gene “*housekeeper*”, cuja expressão genética ocorre em níveis abundantes na maioria dos tipos celulares e codifica uma proteína constantemente encontrada no citoesqueleto das mais variadas espécies sendo por isso, utilizada como modelo interno na grande maioria dos ensaios de RT-PCR (KREUZER *et al.* 1999, BUSTIN, 2000). Os valores dos “Cycle threshold” (ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção - CT) foram obtidos para MMP-2, MMP-9 e β -actina para cada amostra de cDNA do tecido laminar de eqüinos dos quatro grupos experimentais.

A curva padrão relativa foi construída utilizando-se cDNA preparado do RNA isolado das amostras de tecido laminar contendo genes que codificam tanto as MMP quanto a β -actina. Ao cDNA concentrado foi designado o valor de 1000. Diluições seriadas (1:1) foram então preparadas em ddH₂O, com a primeira diluição designada 500, a segunda 250, e assim sucessivamente, até oito diluições serem feitas. Uma curva padrão foi construída tanto para as β -actina quanto para as MMP (Fig. 3, 4 e 5)

Essas análises foram realizadas nas dependências do Department of Pathobiological Science da School of Veterinary Medicine-Louisiana State University, Baton Rouge, LSU, USA.

4.2.5. Análise Estatística

A regressão linear foi realizada nos valores obtidos para β -actina e MMP como descrito no ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2²⁹. Os valores obtidos para as MMP foram normalizados contra os valores da β -actina de cada amostra e as diferenças do mRNA foram comparadas utilizando-se o método comparativo de CT ($\Delta\Delta C_T$). Os resultados foram apresentados como vezes a mais que

²⁹ Applied Biosystems Foster City, California - EUA.

a expressão gênica ocorreu nos grupos comparado com a média do grupo controle (GAS) \pm EP.

Os dados da expressão gênica da MMP-2 e MMP-9 foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e, posteriormente, à análise de variância de uma via não-paramétrica seguida do teste Dunn para comparação das médias (Sigma Stat³⁰). Foi considerado um nível de significância de $p \leq 0,05$.

³⁰ Sigma Stat for Windows, Version 3.0.1. Systat Software Inc. CA, EUA.

Tabela 1 – Sequência de primers e sondas utilizadas para quantificar os níveis de MMP-2, MMP-9 e β -actina no tecido laminar de eqüinos sadios e aqueles com laminite experimental tratados ou não com solução tampão. Todas as sequências foram escritas na direção 5'-3'. As sondas foram marcadas com o reporter “dye” FAM (6-carboxyfluorescein) e o quencher dye TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine).

| Gene | Oligo | Sequence (5'-3') |
|----------------------------------|------------|-----------------------------------|
| β-actina | Sense | GCATGGAATCCTGTGGCAT |
| | Anti Sense | GGTCCTTACGGATGTGACG |
| | Sonda | CACGAAACTACCTTCAACTCCATCATGAAGTGT |
| MMP-2 | Sense | AGTGGATGTGACCCCACTACGGT |
| | Anti sense | TGCTCCCAGCGGCCGAATG |
| | Sonda | ATGTCAGCCTCTCCATCATGGATGAG |
| MMP-9 | Sense | CGGCGTGCCCTTGGGA |
| | Anti Sense | GAAGCGGTCCTGGGAGAAGT |
| | Sonda | ATGCACGACGTCTTCCAGTACCGAGAGA |

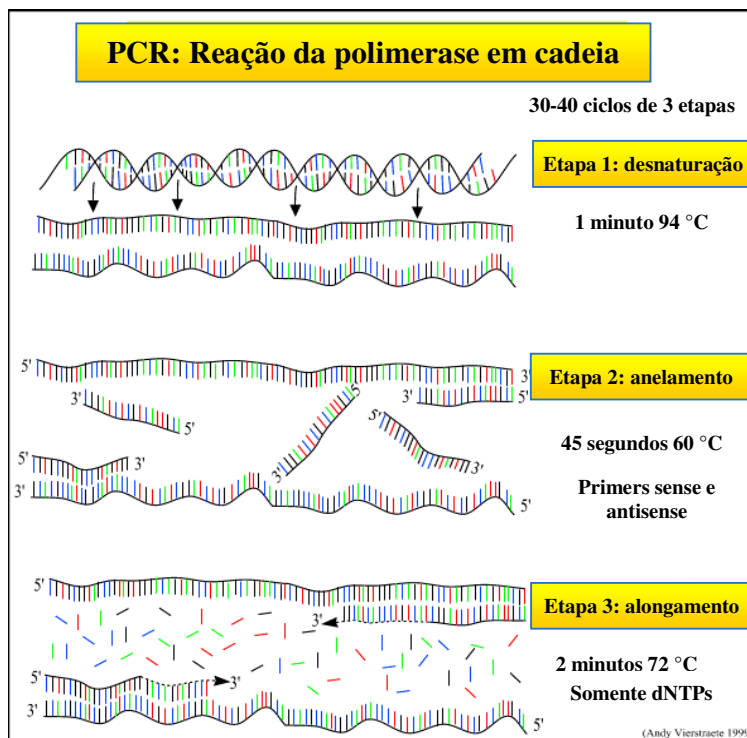


Figura 1 – Figura ilustrativa dos ciclos da reação em cadeia da polimerase (Vierstraete, 1999). Fonte: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

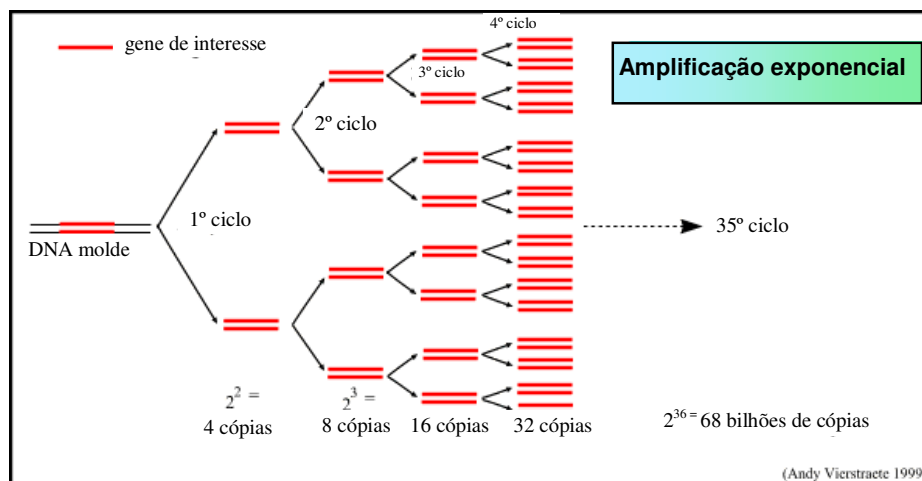


Figura 2 – Figura ilustrativa dos ciclos da reação e da amplificação exponencial do DNA pela reação em cadeia da polimerase (Vierstraete, 1999). (Fonte: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

4.3. RESULTADOS

Para a curva padrão de cada enzima testada foram feitas diluições seriadas variando de 1000 a 8 e utilizadas como modelo para as análises. Os valores dos CT aumentaram em cada diluição, variando de 29,04 a 40 ciclos para a MMP-2, de 27,02 a 36,04 ciclos para a MMP-9 e de 21,31 a 30,60 ciclos para a β -actina. Por essa razão, sob as condições testadas da RT-PCR em tempo real, a quantificação demonstrou ser linear de 100 a 100.000 cópias iniciais do modelo de DNA por reação. A linha calculada por regressão logarítmica para cada enzima está representada pelas equações:

MMP-2

$$y = -6,0582x \text{ (número de cópias)} + 47,572, \text{ com } R^2 = 0,9956; \text{ (Fig. 3)}$$

MMP-9

$$y = -3,6442x \text{ (número de cópias)} + 39,037, \text{ com } R^2 = 0,9739; \text{ (Fig. 4)}$$

β -actina

$$y = -3,6442x \text{ (número de cópias)} + 39,037, \text{ com } R^2 = 0,9739; \text{ (Fig. 5)}$$

Foram realizadas duas medidas de cada amostra de DNA do tecido laminar digital dos animais de cada grupo. A porcentagem do coeficiente de variação (CV%) entre as medidas para MMP-9 variou de 0,00 a 0,01% tanto no GCS quanto no GCT com uma média geral de 0,01% e no GAS e GCT variou de 0,00 a 0,01% e 0,00 a 0,09% respectivamente, com uma média geral de 0,02% para ambos os grupos. Para as medidas da MMP-2, a porcentagem do coeficiente de variação (CV%) variou de 0,00 a 0,01% tanto no GCS quanto no GCT com uma média geral de 0,01% e no GAS e GCT variou de 0,00 a 0,01% e 0,00 a 0,02% respectivamente, com uma média geral de 0,00% para ambos os grupos. Os valores de CT (média dos animais dentro cada grupo) para as medidas da MMP-2 e MMP-9 mostraram um CV > 1% para todos os grupos.

As expressões constitutivas das enzimas MMP-2 e MMP-9 foram observadas em todas as amostras, tanto nos eqüinos expostos a sobrecarga de CHO quanto nos animais clinicamente sadios. Entretanto, a expressão gênica de MMP-2 ($p=0,037$) e MMP-9 ($p=0,012$) foi mais acentuada nos tecidos dos animais laminíticos (GCS, GCT) comparados aos tecidos obtidos de eqüinos clinicamente sadios (GAS, GAT) (Fig. 6 e 7).

A expressão relativa das enzimas MMP para os eqüinos com laminite foi calculada com relação ao nível de expressão encontrado em eqüinos clinicamente normais. A expressão gênica da enzima MMP-2 para o GCS e GCT foram, respectivamente, 2,25 e 1,18 vezes maior que a média do GAS (Fig. 7). A expressão gênica da enzima MMP-9 no GCS e GCT foram, respectivamente, 17,79 e 5,06 vezes maior que no GAS (Fig. 8). Quando os resultados de ambos os grupos acometidos com laminite foram comparados, o grupo GCS apresentou expressão maior tanto da enzima MMP-2 quanto da MMP-9 do que o grupo GCT ($p= 0,042$ e $p= 0,048$, respectivamente).

Os resultados obtidos para a expressão gênica da β -actina foram analisados e não demonstraram nenhuma diferença entre os grupos experimentais (Fig. 5).

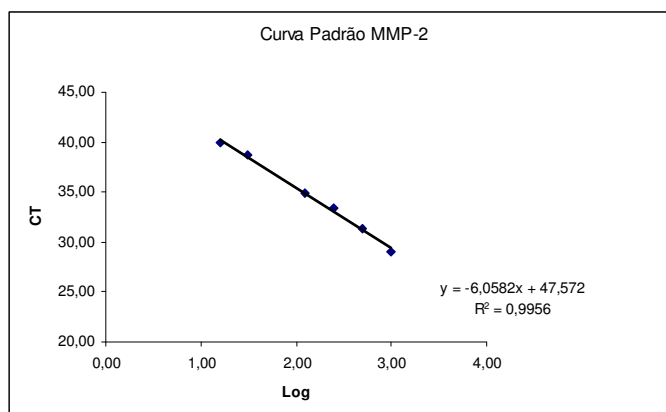


Figura 3 – Representação gráfica da curva padrão relativa da enzima MMP-2.

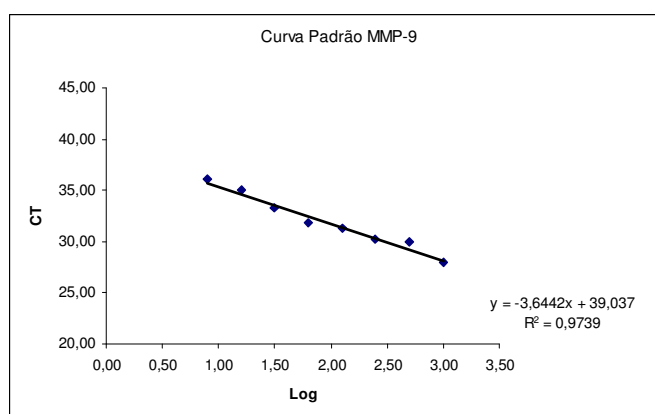


Figura 4 – Representação gráfica da curva padrão relativa da enzima MMP-9.

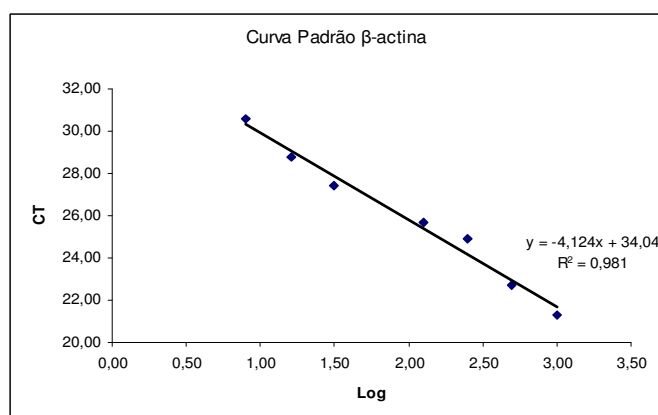
Figura 5 – Representação gráfica da curva padrão relativa da β -actina.

Tabela 2 – Média e erro padrão da expressão gênica da β -actina e das enzimas MMP-2 em tecido laminar de eqüinos dos grupos GAS (controle), GAT (controle tampão), GCT (CHO-tampão) e GCS (controle CHO) 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | mRNA | | |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | β -actina | MMP-2 | MMP-9 |
| GAS | 1,00 ^a [0,00] | 1,00 ^a [0,00] | 1,00 ^a [0,00] |
| GAT | 1,45 ^a [0,56] | 0,32 ^a [0,08] | 0,72 ^a [0,29] |
| GCT | 1,04 ^a [0,72] | 1,18 ^a [0,63] | 5,06 ^b [0,91] |
| GCS | 1,17 ^a [0,90] | 2,25 ^c [0,83] | 17,19 ^c [9,58] |

Valores apresentados como “vezes a mais” em relação ao grupo controle (GAS)

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Dunn, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

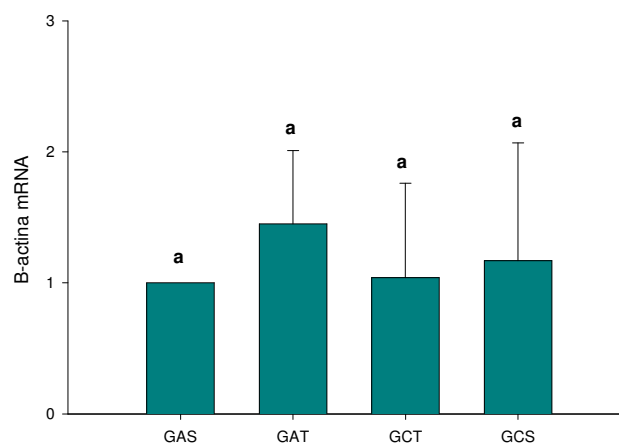


Figura 6 - Representação gráfica da expressão gênica da β -actina em tecido laminar de eqüinos dos grupos GCT (CHO-tampão), GCS (controle CHO), GAT (controle tampão), 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. Os valores estão apresentados como “vezes a mais” comparado com o grupo controle (GAS) \pm EP (teste Dunn $p \leq 0,05$).

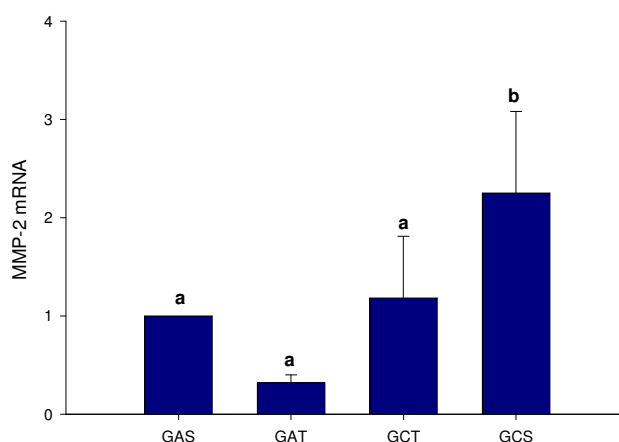


Figura 7 – Representação gráfica da expressão gênica da enzima MMP-2 em tecido laminar de eqüinos dos grupos GAS (controle), GAT (controle tampão), GCT (CHO-tampão) e GCS (controle CHO) 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. Os valores estão apresentados como “vezes a mais” em relação ao grupo controle (GAS) \pm EP (teste Dunn $p \leq 0,05$).

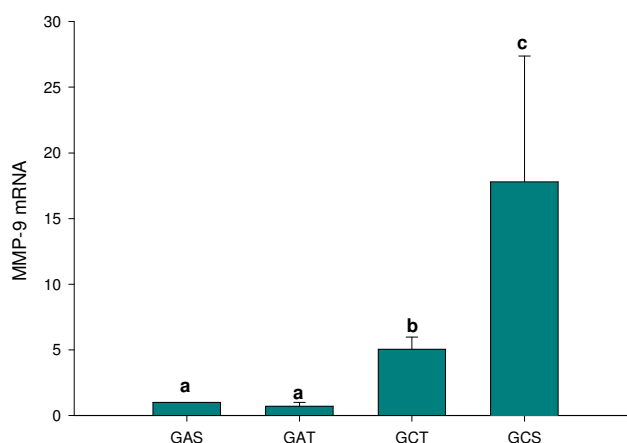


Figura 8 - Representação gráfica da expressão gênica da enzima MMP-9 em tecido laminar de eqüinos dos grupos GAS (controle), GAT (controle tampão), GCT (CHO-tampão) e GCS (controle CHO) 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. Os valores estão apresentados como “vezes a mais” comparado com o grupo controle (GAS) \pm EP (teste Dunn $p \leq 0,05$).

4.4. DISCUSSÃO

A utilização da β -actina para a normalização dos dados das enzimas MMP-2 e MMP-9 mostrou-se bastante acurada uma vez que os resultados obtidos para esse gene, expresso continuamente no citoesqueleto dos mamíferos, não apresentaram diferença entre os grupos experimentais.

As expressões constitutivas das enzimas MMP-2 e MMP-9 observadas tanto nos tecidos laminares de animais saudáveis quanto daqueles com laminite experimental confirmam que estas enzimas estão envolvidas em processos fisiológicos, os quais, segundo Woessner, (1991) e Birkedal-Hansen et al. (1993) são responsáveis de degradação da matriz extracelular e de componentes e moléculas da membrana basal. Uma vez que os componentes moleculares dos desmossomos, hemidesmossomos e membranas basais são substratos para a atividade das MMP, a localização da MMP-2 no tecido laminar basal e nas células parabasais possui significado fisiológico na função de remodelação, permitindo que a parede do casco mova-se através da falange distal conforme o crescimento ocorre (DARAKA & POLLITT, 2004).

Os níveis elevados de expressão gênica da MMP-9 observados nos tecidos laminares de eqüinos com laminite experimental tratados com solução tampão (GCT), os elevados níveis de expressão gênica da MMP-2 e MMP-9 nos tecidos laminares de eqüinos com laminite experimental não-tratados (GCS) e a baixa expressão delas em tecido dos eqüinos do grupo controle, sugerem que ocorre ativação destas enzimas durante o desenvolvimento da laminite, dando suporte a hipótese de que a ativação das MMPs está relacionada com o dano na membrana basal, já demonstrado em estudos anteriores com modelos experimentais *in vitro* (POLLITT, 1998; POLLITT & DAVIES, 1998; FRENCH & POLLITT, 2004).

Um fato interessante observado foi que a expressão de MMP-2 comparada à MMP-9 apresentou grande disparidade entre os intervalos de variação das enzimas, com a MMP-2 variando de 0 a 4 e a MMP-9 variando de 0 a 20. Sabe-se que ambas as enzimas possuem algumas características em comum tais como os substratos (colágenos dos tipos IV, VII e elastina) assim como sua presença em macrófagos (BASSET et al., 1997; MURPHY & KNÄUPER, 1997). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a regulação da expressão gênica dessas duas enzimas assim como o

seu status de expressão ocorre de forma diferenciada (MOTT & WERB, 2004). A MMP-2 está presente constantemente nos tecidos em níveis baixos de expressão, assemelhando mais com uma MMP constitutiva e sua ativação ocorre por mecanismo de regulação pós-transcricional. Enquanto a MMP-9 é altamente induzida sendo que sua expressão gênica ocorre por regulação transcricional (MOTT & WERB, 2004).

No entanto, apesar do aumento dos níveis de expressão de MMP-2 apresentarem menor amplitude do que os da MMP-9, este aumento também foi significativo no grupo controle-CHO (GCS) quando comparado ao grupo controle (GAS), demonstrando que ambas estão envolvidas na patogênese da laminite. Os dados obtidos para o grupo CHO-tampão indicam que o tratamento diminuiu a intensidade da expressão da MMP-9, embora essa expressão tenha sido maior do que os níveis basais do grupo controle (GAS). Por outro lado, o tratamento foi capaz de atenuar o aumento da expressão da MMP-2.

Foi demonstrado no Capítulo 2 que a administração intracecal de solução tampão composta por $Al(OH)_3$ e $Mg(OH)_2$ atrasou os sinais de claudicação em equinos com laminite experimental induzida com sobrecarga de CHO, no entanto isso não previniu as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas induzida pelo CHO ainda que ao final do período experimental, 100% dos animais expostos a sobrecarga de CHO (GCS e GCT) desenvolveram laminite. Poder-se-ia supor que existam dois mecanismos distintos mediados pela ativação das MMP endógenas que levam ao desencadeamento da laminite, como já aventado por LOFTUS et al. (2006). Essa especulação é suportada pelo fato da indução de MMP-2 ter sido observada em tecido laminar obtido de equinos expostos à sobrecarga de CHO e de equinos com laminite crônica (JONHSON et al., 1998; MUNGALL & POLLITT, 1999). KYAN-TANNER & POLLITT (2004) demonstraram aumento na transcrição de MMP-2 em tecido laminar de equinos expostos à sobrecarga de CHO coletados na fase prodrômica da doença. Da mesma maneira, foi demonstrado que a MMP-9 está presente, difusamente, ao redor da membrana basal danificada no tecido laminar de cavalos expostos à sobrecarga de CHO, sugerindo que esta enzima possa ser induzida localmente (Mungall et al., 1998). LOFTUS et al. (2006) observaram que a migração de neutrófilos para o tecido digital na laminite induzida por extrato de NP coincide com o acúmulo de zimogênios da enzima

MMP-9 e com a expressão gênica aumentada de MMP-9 transcrito. Desta forma, os resultados obtidos mostraram que a expressão gênica da enzima MMP-9 em níveis maiores àqueles expressos para a enzima MMP-2 é uma informação importante, uma vez que inúmeros estudos tentam elucidar o significado das diferentes MMP no colapso da membrana basal e, conseqüentemente, na patogênese da laminite.

O fato de a solução tampão diminuído a expressão das MMP foi evidente e mostra a sua eficácia visto que, nos tecidos dos animais que receberam a sobrecarga de CHO tratados com solução tampão a expressão da MMP-2 não apresentou diferença significativa comparado com o grupo controle, e a expressão da MMP-9 foi menor do que no grupo controle-CHO, corroborando com achados de que a diminuição do pH cecal está diretamente envolvida no desenvolvimento da laminite associada com a sobrecarga de CHO (GARNER et al., 1978; MOORE et al., 1979; AITCHISON et al., 1987).

WEISS et al. (2000) demonstraram que a fermentação do CHO em excesso no ceco pode aumentar a permeabilidade da mucosa cecal e está diretamente associada com a laminite induzida por sobrecarga de CHO. A diminuição do pH agride a mucosa permitindo a passagem de fatores tóxicos tais como, exotoxinas, endotoxinas e poliaminas vasoativas para a circulação sistêmica. Nos últimos anos, estudos têm fornecido evidências que dão suporte à hipótese de que o início do desenvolvimento da laminite se dá devido a fatores tóxicos, tais como aminas de origem bacteriana, transportados pelo sangue que ativam as MMP (MUNGALL et al., 2001; MUNGALL & POLLITT, 2002), levando a degradação da matriz extracelular e de componentes da membrana basal e, conseqüentemente, ao rompimento da relação entre as lâminas dérmicas e epidérmicas (van EPS & POLLITT, 2004).

As proteases endógenas foram consideradas como prováveis fatores responsáveis pela ativação das MMP na maioria dos processos fisiológicos e patológicos, mas a possibilidade de que essa ativação possa ser disparada por proteinases exógenas também tem sido estudada. Estudo realizado com a elastase produzida pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou que essa protease foi capaz de ativar a MMP-2 (MATSUMOTO et al., 1992). OKAMOTO et al. (1997) observaram que MMP-1, MMP-8 e MMP-9 poderiam ser ativadas por proteases

bacterianas pertencentes à família da termolisina entre elas, a elastase da *P. aeruginosa*, a protease *Vibrio cholerae* e a termolisina. MUNGALL & POLLITT (2002) demonstraram que a termolisina bacteriana foi capaz de ativar MMP-2 e MMP-9 em tecido laminar.

Assim, o excesso de substrato fermentável que chega ao ceco de eqüinos expostos à sobrecarga de CHO determina profundas alterações na população bacteriana cecal com proliferação rápida de bactérias Gram-positivas produtoras de ácido láctico, resultando em produção excessiva de lactato e declínio rápido no pH intracecal (GARNER et al., 1977; GARNER et al., 1978).

O pH cecal baixo reduz o pH intracelular com conseqüente redução na atividade enzimática, assim, diminuindo ou inibindo o crescimento celular de algumas bactérias ou mesmo determinando sua morte, enquanto outras, mais adaptadas ao pH baixo, como o *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus sp* proliferam-se ainda mais. Sendo assim, poder-se-ia supor que o aumento da população bacteriana possibilitaria uma elevação na produção de proteases bacterianas que atingiriam a circulação sistêmica, chegando ao tecido laminar e ativando as MMP.

Dando suporte ao argumento de que o fluxo sangüíneo seria responsável pelo transporte de fatores tóxicos responsáveis pelo desenvolvimento da laminite, van EPS & POLLITT (2004; 2006) observaram que a crioterapia local do dígito de eqüinos submetidos ao modelo das frutanas para indução da laminite, previniu as alterações clínicas e os danos histológicos associados com essa doença. Eles sugerem que a redução criogênica do fluxo sangüíneo reduz a chegada de toxinas no tecido digital, preservando desta maneira a integridade celular e a homeostase normal do tecido laminar.

Nesse sentido a solução tampão, ao minimizar a intensidade da acidificação cecal, como demonstrado no capítulo 2, possivelmente inibindo a proliferação bacteriana³¹ possa ter, indiretamente, reduzido a expressão gênica da MMP-2 e MMP-9.

³¹ Souza 2006 (resultados não publicados)

4.5. CONCLUSÃO

Baseado nos achados deste estudo pode-se concluir que:

1. Tanto a enzima MMP-2 quanto a MMP-9 possuem expressão constitutiva nos tecidos laminares de animais saudáveis e de animais com laminite experimental;

2. Os aumentos da expressão gênica da MMP-9 observados nos tecidos laminares de eqüinos com laminite experimental tratados com solução tampão e da expressão gênica da MMP-2 e MMP-9 em eqüinos com laminite experimental sem tratamento, sugerem a participação destas enzimas durante o desenvolvimento da laminite;

3. Os níveis de expressão da MMP-9 detectados foram maiores em relação ao da expressão da MMP-2 em eqüinos com laminite experimental por sobrecarga de CHO;

4. Apesar do aumento na expressão gênica da MMP-2 e MMP-9 não ter sido completamente bloqueado, a expressão de ambas as MMPs apresentou-se reduzida quando comparada ao grupo exposto a sobrecarga de CHO e sem tratamento (GCS).

4.5. REFERÊNCIAS

AITCHISON, E.M. et al. Feed antibiotics and buffers to control rumen lactic acid. 2. Predosing. *Proc. Nutr. Soc.* v.46, p.41A, 1987.

BASSET, P. et al. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol.*, v.15, p.535-541, 1997.

BIRKEDAL-HANSEN, H. et al. Matrix Metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v.4, p.197-250, 1993.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, v.162, n.1, p.156-159, 1987.

DARADKA, M.; POLLITT, C.C. Epidermal cell proliferation in the equine hoof wall. *Equine Vet. J.*, v.36, n.3, p.236-241, 2004.

FRENCH, K.R.; POLLITT, C.C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermica lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. *Equine Vet. J.*, v.36, n.3, p.230-235, 2004.

GARNER, H.E. et al. Lactic acidosis: a factor associated with equine laminitis. *J. Anim. Sci.*, v.45, p.1037-1041, 1977.

GARNER, H.E. et al. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet. J.*, v.10, p.249-252, 1978.

HOOD, D.M. et al. The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. *J. Vet. Intern. Med.*, v.7, p.228-234, 1993.

JOHNSON, P.J. et al. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. *Vet. Record.*, v.142, n.15, p.392-396, 1998.

KREUZER, K.A. et al. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. *Clin. Chemistry*, v.45, p.297–300, 1999.

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

LOFTUS, J.P.; BELKNAP, J.K.; BLACK, S.J. Matrix metalloproteinase-9 in laminae of black walnut extract treated horses correlates with neutrophil abundance. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.113, n.3-4, p.267-276, 2006.

MATSUMOTO, K. et al. Proteolytic activation of corneal matrix metalloproteinase by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Curr. Eye Res.*, v.11, p.1105-1109, 1992.

MOORE, J.N. et al. Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis: a preliminary report. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.722-723, 1979.

MOTT, J.D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin Cell Biol.*, v.16, n.5, p.558-564, 2004.

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

MUNGALL, B.A.; POLLITT, C.C. Thermolysin activates equine lamellar hoof matrix metalloproteinases. *J. Comparative Pathology.*, v.126, n.1, p.9-16, 2002.

MURPHY, G.; KNAUPER, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the 'hemopexin' domain? *Matrix Biol.*, v.15, p.511–518, 1997.

NAGASE, H.; WOESSNER, J.F. Matrix Metalloproteinase. *J. Biol. Chem.*, v.274., n.32, p.21491-21494, 1999.

OKAMOTO, T. et al. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J. Biol. Chem.*, v.272, n.9, p.6059-6066, 1997.

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

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

POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. *Proceedings Am. Assoc. Equine Pract.*, v.45, p.188-192, 1999.

POLLITT, C.C. The basement membrane at the equine hoof dermica epidermica junction. *Equine Vet. J.*, v.26, p.399-407, 1994.

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

ROWE, J.B.; PETHICK, D.W.; LEES, M.J. Prevention of acidosis and laminitis associated with grain feeding in horses. *J. Nutr.*, v.124, p.2742-2744, 1994.

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

WEISS, D.J. et al. *In vitro* evaluation of intramural arch endothelial cells and hoof keratinocytes. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.858-861, 2000.

WOESSNER, J.F.J. Matrix metalloproteinase and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, v.5, p.2145-2154, 1991.

CAPÍTULO 5 – QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS EM CONTEÚDO CECAL DE EQÜINOS COM LAMINITE EXPERIMENTAL, APÓS TAMPONAMENTO CECAL.

RESUMO – A laminite aguda tem sido associada com alteração na fermentação cecal com produção de substâncias que afetam o fluxo sanguíneo digital por suas propriedades vasoativas. Objetivou-se identificar e quantificar as aminas produzidas no ceco de eqüinos com laminite experimental induzida por sobrecarga de carboidrato, tratados ou não com solução tampão, quando comparados com eqüinos clinicamente sadios tratados ou não com solução tampão. Amostras do conteúdo cecal (50 mL) foram coletadas de 22 eqüinos, distribuídos em quatro grupos experimentais: controle (GAS, n=5); controle tampão (GAT, n=5); controle CHO (GCS, n=6) e CHO-tampão (GCT, n=6) imediatamente antes da administração do CHO ou da salina (T0) e 8, 12, 24 e 48 horas após para a identificação e quantificação das aminas por cromatografia líquida. Dez aminas foram pesquisadas, sendo que oito delas foram identificadas no conteúdo cecal: putrescina, cadaverina, espermidina, histamina, agmatina, tiramina, feniletilamina e serotonina. As concentrações cecais da putrescina e cadaverina se apresentaram elevadas em todos os eqüinos expostos à sobrecarga de CHO (GCS e GCT) quando comparados aos controles (GAS). Comparando-se os dois grupos expostos ao CHO, notou-se que o GCS apresentou maior concentração de putrescina. Foi demonstrado que a fermentação de carboidrato cecal aumenta a produção de cadaverina e putrescina e ainda, que a administração da solução tampão reduz o aumento na produção da putrescina em cavalos com laminite induzida por sobrecarga de CHO. O modelo utilizado não alterou a concentração de aminas conhecidamente vasoativas.

Palavras-chave: aminas, laminite, eqüino.

CECAL BIOACTIVE AMINES QUANTIFICATION IN HORSES WITH LAMINITIS INDUCED EXPERIMENTALLY AND AFTER THE CECAL BUFFERING.

SUMMARY – Acute laminitis has been associated with non-identified compounds produced by cecal fermentation, which affect digital blood flow. The objective of this study was to identify and quantify amine compounds, some of which are known to have vasoactive properties, in cecal contents of horses with carbohydrate-overload (CHO) experimental induced laminitis treated with saline solution (control) or buffering solution, compared to health horses. Twenty two studied horses were divided in 4 treatment groups: negative control (WS, n=5); positive buffer control (WB, n=5); CHO-induced laminitis (CS, n=6); and CHO-induced laminitis with buffer treatment (CB, n=6). Samples of cecal contents (50 ml) were collected before (T0) and after administration of saline and CHO at 8, 12, 24 and 48 hours in order to measure the concentration of amines using HPLC. Ten bioactive amines were investigated and 8 of them were identified in the equine cecal contents: putrescine, cadaverine, spermidine, histamine, agmatine, tyramine, phenylethylamine and, serotonin. The cecal concentration of putrescine and cadaverine were significantly higher in horses with overload of CHO (GCS) and treated with buffering solution (GCT) when compared to the control group (GAS). Comparing both CHO-induced laminitis groups (GCS and GCT), it was observed that putrescine concentration was lower in GCT. The results showed the cecal fermentation of carbohydrate increase the production of putrescine and, the administration or treatment with buffer solution ameliorate the increase of putrescine production in horses with laminitis induced by CHO overload. This model did not alter the concentration of vasoactive amines.

Key-word: amines, laminitis, horse.

5.1. INTRODUÇÃO

A laminite aguda é uma condição comum e debilitante em eqüinos e pôneis, sendo que sua fisiopatologia ainda não foi completamente elucidada. Nas últimas décadas, inúmeros estudos a têm reconhecido como seqüela importante de distúrbios gastrintestinais. A fermentação de carboidratos no ceco e cólon eqüino, com o concomitante crescimento de bactérias gram-positivas e queda do pH, já foi demonstrada experimentalmente como causa de laminite aguda (GARNER et al., 1978) e está associada com alterações da perfusão digital devido a alterações sistêmicas (HOOD et al., 2001) demonstrando que substâncias oriundas do trato gastrintestinal poderiam ser consideradas como possíveis agentes da doença laminar.

Aminas têm sido encontradas em alimentos fermentados (McCABE, 1986) e em conteúdo intestinal tanto de ruminantes como em monogástricos (HILL & MANGAN, 1964; HILL et al., 1970). Aminas bioativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas com baixo peso molecular, que se originam de processos metabólicos em animais, plantas e microorganismos. Essas aminas resultam primariamente da descarboxilação enzimática de aminoácidos por bactérias (RICE & KOEHLER, 1976; HURST, 1990; HALÁSZ et al., 1994).

Inúmeras bactérias são capazes de produzir aminas, entre elas bactérias gram-positivas do gênero *Streptococos* e *Lactobacilos* (GOLOVNYA et al., 1969; LEUSCHNER & HAMMES, 1999) bem como outras espécies de bactérias Gram-negativas e por isso estão presentes em grandes concentrações no ceco de eqüinos (BAILEY et al., 2002). Concentrações elevadas de aminas têm sido observadas quando se adiciona amido ou frutana em excesso ao conteúdo cecal, *in vitro* (BAYLEY et al., 2002). Quando são fornecidas grandes quantidades de substrato fermentável para as bactérias cecais, os organismos Gram-positivos proliferam e passam a produzir ácido láctico (GARNER et al., 1978). Nessas condições ácidas, a descarboxilação de aminoácidos dentro do ceco aumenta e, por conseguinte, a produção de aminas (BEARSON et al., 1997).

Muitos desses compostos amínicos atingem a circulação sistêmica em concentração suficiente para exercer efeitos vasculares, devido às similaridades estruturais com aminas endógenas tais como as catecolaminas e a serotonina (5-HT)

(RANG & DALE, 1991). Entre esses efeitos, observa-se a vasoconstrição mediada pela interação direta ou indireta com receptores da serotonina ou adrenoreceptores de artérias e veias (BAILEY et al., 2001; BERHANE et al., 2002) ou ainda, ativação da agregação plaquetária (ELLIOT et al., 2003). Apesar de não ser aceita universalmente, a isquemia digital seguida pela injúria de reperfusão é considerada como sendo a sequência de eventos que culmina em laminite aguda (HOOD et al., 1993; HOOD et al., 2001), e por isso essas aminas produzidas no ceco dos eqüinos são consideradas capazes de disparar mudanças observadas na fase podrômica da laminite aguda.

BAILEY et al. (2004) demonstraram que, aminas produzidas no intestino grosso de eqüinos após a sobrecarga de CHO, se liberadas na circulação sistêmica, atuam de maneira seletiva na circulação digital, podendo contribuir para a vasoconstrição que ocorre durante o desenvolvimento da laminite.

A hipótese aqui estudada foi que a administração de uma solução tampão por via intracecal poderia influenciar na produção de aminas bioativas pelas bactérias gram-positivas da microflora cecal. O objetivo desse estudo foi identificar e quantificar as aminas do conteúdo cecal de eqüinos com laminite experimental induzida por sobrecarga de carboidrato, tratados ou não com solução tampão, quando comparados com eqüinos clinicamente saudáveis.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Amostras

Amostras do conteúdo cecal (50 mL) foram coletadas de 22 eqüinos com o ceco previamente canulado, oito machos castrados e 14 fêmeas não-gestantes, sem raça definida, adultos, hígdos, com idades variando de três a nove anos, pesando entre 200 e 370 kg e com escore corporal de três a quatro, segundo SPEIRS (1997). Esses animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: controle negativo (GAS, n=5); controle positivo tampão (GAT, n=5); controle positivo laminite (GCS, n=6); grupo experimental (GCT, n=6), conforme descrito no capítulo 2.

5.2.1.a. Preparo das Amostras

As amostras de conteúdo cecal foram colhidas por meio de bombeamento à vácuo através da cânula cecal imediatamente antes da administração do CHO ou da salina (T0) e 8, 12, 24 e 48 horas após. O pH foi mensurado por meio de fitas indicadoras de pH³² no momento da colheita. As amostras foram primeiramente coadas para remoção de partículas fibrosas grandes. Em seguida, foram centrifugadas a 1500 g por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante resultante foi filtrado em filtro de papel³³, aliquotado e estocado em freezer -70 °C, até serem analisados quanto à produção de aminas bioativas (cadaverina, agmatina, espermina, espermidina, putrescina, tiramina, triptamina, feniletilamina, histamina e serotonina).

5.2.2. Determinação de Aminas Bioativas pelo Método de HPLC (High Performance Liquid Cromatography)

Os teores de aminas bioativas foram determinados no líquido cecal. Foram separados 5 mL de cada amostra em tubos de centrifuga de polipropileno, aos quais foram adicionados 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Os tubos foram agitados por 10 minutos em mesa agitadora³⁴ a 248 x g, e centrifugados a 10.000 X g a 4º C, por 21 minutos em centrífuga refrigerada³⁵. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro quantitativo. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes com adições de

³² pH Universal Indikator strips (0-14), Merck & Co., Inc, NJ, USA

³³ n°1 Whatman B

³⁴ Tecnal TE140 (Piracicaba, SP)

³⁵ Jouan CR31 Saint-Herblain, França.

7 e 6 mL de TCA 5%, totalizando 20 mL de ácido adicionado. Os extratos foram combinados e depois filtrados em membrana HAWP³⁶ (13 mm de diâmetro e poros de 45 µm).

As aminas bioativas foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência por pareamento de íons em coluna de fase reversa, e quantificadas por fluorimetria após derivação pós coluna com o-ftalaldeído (VALE & GLÓRIA, 1997; BAILEY et al., 2002). O cromatógrafo³⁷ utilizado foi composto por três bombas³⁸, com conjunto de lavagem automática do pistão, injetor automático³⁹, detector espectrofluorimétrico⁴⁰ a 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente, e uma unidade de controle⁴¹ conectada a um microcomputador.

Foi utilizada coluna⁴² de fase reversa e pré-coluna⁴³ de 10 µm, empregando-se duas fases móveis: fase móvel A composta de: solução tampão contendo acetato de sódio 0,2 M e octanossulfonato de sódio 15 mM, com pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial; e fase móvel B composta de acetonitrila. Estas soluções foram filtradas em membranas com 47 mm de diâmetro e 0,45 µ o tamanho do poro (HAWP⁴⁴ para a fase A e HVWP⁴⁵ para a fase B). As fases móveis foram utilizadas em um fluxo de 0,8 mL/min, com gradiente de eluição com tempo (min)/% B de 0,01/11; 13/11; 19/26; 24/11; 45/11 e término aos 55 min. A derivação pós-coluna foi realizada por meio de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna em um tubo de teflon de 2 m de comprimento conectando a câmara ao detector de fluorescência.

A solução derivante consistiu de 0,2 g de o-ftalaldeído dissolvido em 3 mL de metanol, diluídos em solução de 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio para 500 mL de água (pH 10,5 a 11,0). Foram adicionados a esta solução 1,5 mL de Brij 35⁴⁶ e 1,5 mL de mercaptoetanol⁴⁷. Esta solução foi preparada diariamente e mantida sob abrigo da luz. A identificação das aminas foi feita por comparação entre o

³⁶ Millipore Corp, Milford, MA, EUA.

³⁷ Shimadzu, Kioto, Japão.

³⁸ Modelo LC-10 AD e LC-10 ADVP Shimadzu, Kioto, Japão.

³⁹ SIL-10 ADVP Shimadzu, Kioto, Japão.

⁴⁰ Modelo RF-551 Shimadzu, Kioto, Japão.

⁴¹ CBM-10 AD. Shimadzu, Kioto, Japão

⁴² µBondapak C18 (3,9 x 300 mm), Waters, Milford, MA, EUA).

⁴³ µBondapak C18, Waters, Milford, MA.

⁴⁴ Millipore Corp, Milford, MA, EUA.

⁴⁵ Millipore Corp, Milford, MA, EUA.

⁴⁶ Merck, Darmstadt, Alemanha

⁴⁷ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA

tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão. As soluções padrão foram analisadas intercaladas às amostras. No caso de dúvida quanto aos picos correspondentes às aminas, a confirmação foi feita por meio da adição de quantidade conhecida de solução padrão da amina suspeita a amostra. A quantificação de aminas foi feita por interpolação em curva padrão externa e estes valores foram multiplicados pelo fator de correção correspondente a cada amina.

Os padrões de aminas⁴⁸ empregados foram: dicloridrato de putrescina (PUT), dicloridrato de cadaverina (CAD_v), cloridrato de tiramina (TIM), dicloridrato de histamina (HIM), cloridrato de 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT), complexo sulfato creatinina agmatina (AGM), tricloridrato de espermidina (EPD), tetracloridrato de espermina (EPM), cloridrato de 2-feniletilamina (FEA) e triptamina (TRM).

A solução-estoque foi preparada por diluição do padrão de cada amina separadamente em ácido clorídrico 0,1 N, formando soluções padrão contendo 1 mg/mL de cada amina. Em seguida, 1 mL de cada solução padrão foi transferido para balão volumétrico, formando uma solução das dez aminas juntas, contendo 100 µg/mL. A partir desta solução foram preparadas as soluções nas concentrações desejadas para análise. Estas foram acondicionadas em tubo hermeticamente fechado, identificadas e armazenadas sob refrigeração até o momento das análises.

As análises para detecção das aminas bioativas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

5.2.3. Análise Estatística

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e, posteriormente, à análise de variância de duas vias, seguida do teste Tukey para comparação de média (SAS⁴⁹). Foi considerado um nível de significância de $p \leq 0,05$.

⁴⁸ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA

⁴⁹ SAS for Windows versão 9.1, SAS Institute, Cary, NC, EUA.

5.3. RESULTADOS

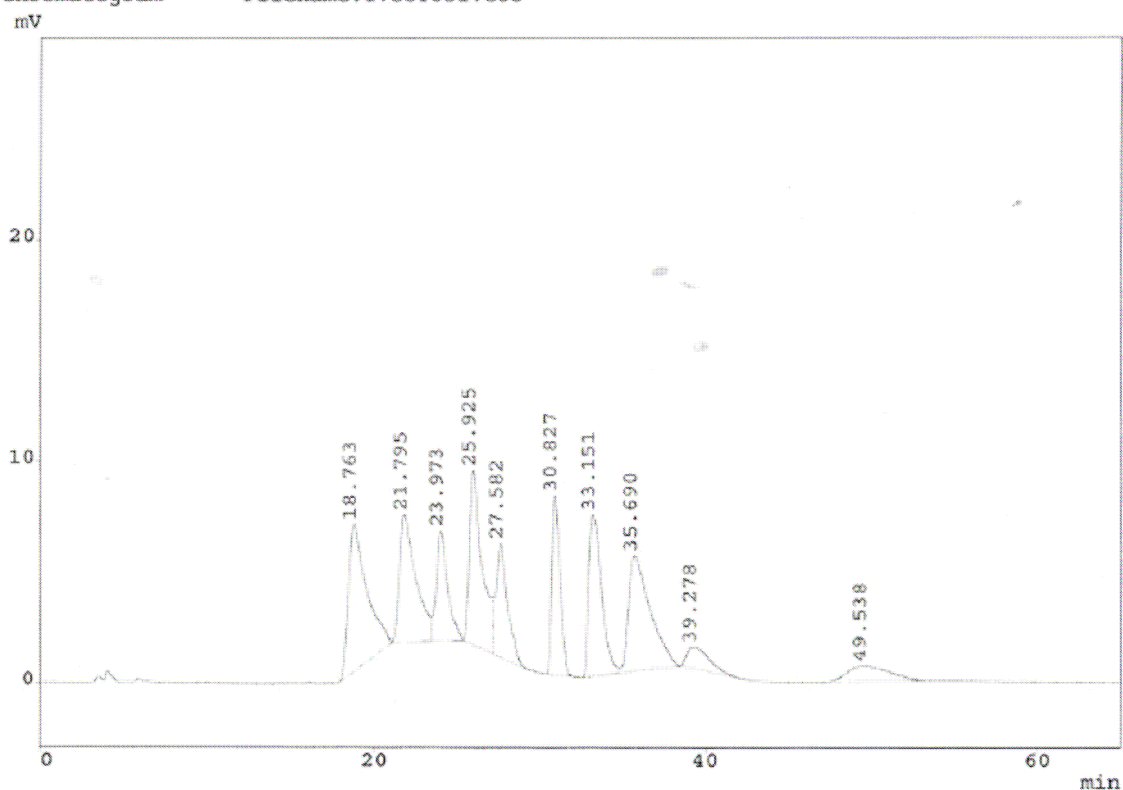
A análise qualitativa das aminas foi realizada em 95 amostras de conteúdo cecal. Dessa maneira, entre dez aminas investigadas, somente oito foram detectadas, de acordo com o tempo de retenção cromatográfico de cada uma (Fig.1), entre elas, putrescina, cadaverina, timina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina e feniletilamina.

A espermina e a triptamina não foram detectadas em nenhuma amostra (limite de detecção 0,04 µg/mL). A putrescina, cadaverina e espermidina foram detectadas em 75%, 85% e 83% das amostras, respectivamente. A histamina foi detectada em 35% das amostras analisadas e a agmatina em 38% sendo que, esta última, apresentou-se em quantidades abaixo do limite de detecção em três amostras. A tiramina foi detectada em 22% e a feniletilamina em 13% das amostras, enquanto a serotonina mostrou-se presente somente em 10% delas.

Ao analisar-se a média das concentrações das aminas dentro de cada grupo no decorrer do período experimental, nos grupos expostos à sobrecarga de CHO, notou-se que as concentrações de putrescina ($p < 0,0001$) e a cadaverina ($p = 0,0206$) aumentaram em relação aos grupos GAS e GAT a partir de 12 e 24 h, respectivamente. Os grupos GAS e GAT não apresentaram alteração.

Na comparação das concentrações de putrescina nos grupos GCS e GCT, foi observado que esta amina mostrou-se aumentada às 12 horas ($p < 0,017$), 24 h ($p < 0,01$) e 48 horas ($p < 0,001$) no grupo exposto à sobrecarga de CHO (GCS) em relação ao grupo que recebeu o CHO associado à solução tampão (GCT) (Tab.1 e Fig.2). Com relação às concentrações da cadaverina, não houve diferenças entre os grupos GCS e GCT durante o período experimental (Tab. 2 e Fig. 3).

*** Chromatogram *** Filename:17OUT051.C66



*** Peak Report ***

| PKNO | TIME | AREA | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|--------|--------|----|------|------|------|
| 1 | 18.763 | 505669 | 6621 | | 1 | | PUT |
| 2 | 21.795 | 393314 | 5713 | | 2 | | CAD |
| 3 | 23.973 | 235581 | 4971 | V | 3 | | TIR |
| 4 | 25.925 | 417721 | 7822 | | 4 | | HIM |
| 5 | 27.582 | 247730 | 5126 | V | 5 | | SER |
| 6 | 30.827 | 275163 | 8044 | | 6 | | AGM |
| 7 | 33.151 | 390742 | 7231 | | 7 | | SPD |
| 8 | 35.690 | 468507 | 5190 | V | 8 | | FEN |
| 9 | 39.278 | 92222 | 972 | | 10 | | SPM |
| 10 | 49.538 | 119209 | 693 | | 9 | | TRM |

 3145856 52382

Figura 1: Cromatograma do tempo de retenção das aminas padrão empregadas para detecção dos teores de aminas bioativas em conteúdo cecal de eqüinos com laminite experimental.

Tabela 1 – Média e desvio-padrão da concentração de putrescina ($\mu\text{g/mL}$) do conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,00 ^a [0,00] | 0,10 ^a [0,09] | 0,00 ^{ac} [0,00] | 0,15 ^a [0,27] | 0,85 ^a [1,30] |
| GCS | 0,33 ^a [0,61] | 1,86 ^a [0,52] | 4,11 ^{b*} [0,99] | 9,89 ^{b*} [3,37] | 12,31 ^{b*} [4,38] |
| GCT | 0,19 ^a [0,26] | 1,97 ^a [0,55] | 1,94 ^c [0,79] | 6,83 ^{c*} [1,19] | 9,76 ^{c*} [4,05] |
| GAT | 0,45 ^a [0,59] | 0,70 ^a [1,00] | 0,68 ^{ac} [1,13] | 0,44 ^a [0,75] | 0,28 ^a [0,62] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

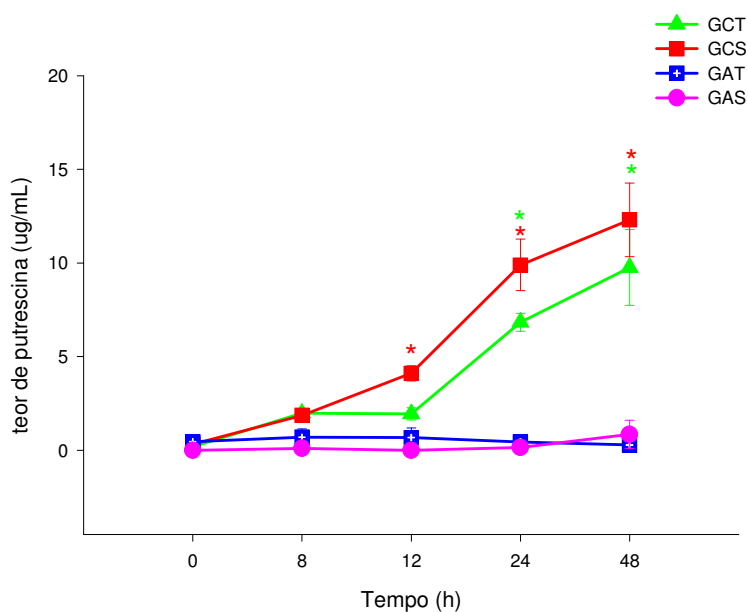


Figura 2 – Representação gráfica das variações da putrescina do conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela 2 – Média e desvio-padrão da concentração de cadaverina ($\mu\text{g/mL}$) obtidos em conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,91 ^a [0,97] | 0,27 ^a [0,24] | 0,78 ^a [0,74] | 2,12 ^a [2,10] | 2,66 ^a [2,42] |
| GCS | 1,20 ^a [1,21] | 0,26 ^a [0,49] | 0,71 ^{a*} [0,78] | 4,69 ^{b*} [2,38] | 8,11 ^{b*} [2,86] |
| GCT | 0,82 ^a [1,13] | 0,44 ^a [0,37] | 0,68 ^{a*} [0,71] | 3,78 ^{b*} [3,47] | 7,05 ^{b*} [4,03] |
| GAT | 0,80 ^a [0,86] | 0,61 ^a [0,80] | 0,49 ^a [0,61] | 1,69 ^a [2,01] | 1,83 ^a [2,30] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

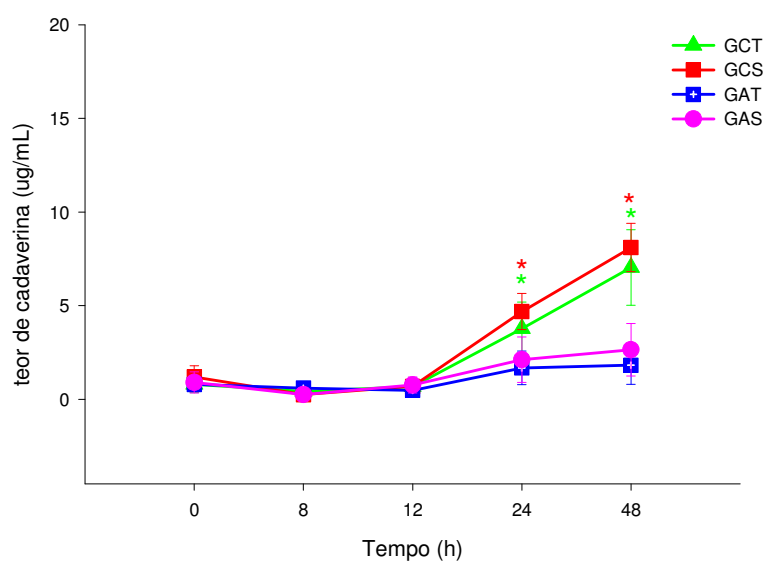


Figura 3 – Representação gráfica das variações da cadaverina do conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO. *Diferente do valor basal (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

5.4. DISCUSSÃO

A metodologia de HPLC aplicada neste estudo é amplamente utilizada para determinação das aminas biogênicas em vinhos e queijos (VALE & GLORIA, 1997) e mostra-se também efetiva para a detecção de aminas no conteúdo cecal de eqüinos. As concentrações das aminas biogênicas encontradas no conteúdo cecal de eqüinos é comparável àquelas encontradas em gêneros alimentícios e bebidas fermentáveis (KIRCHBAUM et al., 2000; BOVER-CID & HOLZAPFEL, 2001), por isso essa metodologia foi precisa e mostrou grande capacidade de repetição. Embora com pequenas adaptações, esta ferramenta tem sido empregada para a identificação e quantificação de aminas em conteúdo cecal de eqüinos (BAILEY et al., 2002; BAILEY et al., 2003).

BAILEY et al. (2003) identificaram e quantificaram 15 diferentes tipos de aminas vasoativas em concentrações relativamente altas no conteúdo cecal de eqüinos sadios. Esses compostos podem ser produzidos por bactérias Gram-positivas incluindo *Streptococcus* e *Lactobacillus* (GOLOVNYA et al., 1969; LEUSCHENR & HAMMES, 1999) e também por bactérias Gram-negativas (ELLIOT et al., 2003). A produção de aminas por bactérias é influenciada pelo pH do meio, concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis (LIMA & GLORIA, 1999). Em meios ácidos (pH 2,5 a 6,5), a produção de aminas é estimulada como um mecanismo de proteção da bactéria (HALÁSZ et al., 1994), visto que nessas condições de pH as descarboxilases têm melhor nível de atividade. Também se demonstrou que o crescimento bacteriano em meio ácido estimula a formação das descarboxilases (ARNOLD & BROWN, 1978). Neste sentido, a presença de carboidrato fermentável em excesso, aumentaria tanto o crescimento de bactérias quanto a atividade da descarboxilase bacteriana (HALÁSZ et al., 1994), o que supostamente ocorre em eqüinos expostos à sobrecarga de CHO, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que as concentrações de feniletilamina, isoamilamina, putrescina e cadaverina encontram-se aumentadas em condições de fornecimento de excesso de CHO (BAILEY et al., 2002).

Devido a suas similaridades estruturais com aminas endógenas, tais como as catecolaminas e indolaminas, muitas das aminas encontradas no conteúdo cecal de eqüinos, se liberadas, podem exercer efeitos na vasculatura (RANGE & DALE, 1991).

Triptamina, tiramina e feniletilamina causam vasoconstrição em artérias e veias digitais *in vitro*, possivelmente via estimulação de receptores de serotonina ou por liberação da noradrenalina ou ainda, por liberar serotonina de plaquetas (BAILEY et al., 2000; BAILEY et al., 2001). No entanto, os achados obtidos não corroboram com esses autores, uma vez que as aminas demonstradas como potentes agentes vasopressores pelos autores citados não aumentaram suas concentrações no conteúdo cecal dos eqüinos expostos a sobrecarga de CHO ou nos animais controle. Pode ser que a diferença nos resultados se deva ao fato dos estudos terem sido conduzidos em modelos experimentais diferente, sendo um deles *in vivo* e o outro *in vitro*, o que torna as condições experimentais relativamente diferentes, uma vez que a experimentação *in vitro* anula as variações adaptativas de cada indivíduo.

Por outro lado, os aumentos nas concentrações da putrescina e da cadaverina detectados no modelo *in vivo* corroboram o aumento observado no modelo *in vitro*. Sabe-se que as aminas putrescina e cadaverina estão amplamente difundidas na natureza e, embora não se saiba exatamente suas funções, elas estão presentes em concentrações elevadas nas células de tecido com altas taxas de crescimento, renovação celular e metabolismo, sendo indispensáveis à célula (LIMA & GLORIA, 1999).

A prevenção ou ativação da apoptose devido à redução da concentração de poliaminas tem sido discutido controversamente em diversos tipos celulares (SEILER & RAUL, 2005). Estudos demonstraram que a redução dos estoques de putrescina pode ativar a cascata apoptótica (GRASSILLI et al., 1995), uma vez que tipos celulares contendo concentrações altas de putrescina mostraram grande resistência à apoptose (NAKAMURA et al., 2003). Por outro lado, foi observado que o aumento da concentração de putrescina por meio da ativação da expressão da enzima ornitina descarboxilase pode disparar os mecanismos de apoptose celular (PATEL & WANG, 1997). Dessa maneira, as alterações observadas nas concentrações das poliaminas podem não ter sido a causa primária do aumento da apoptose, mas também poderia ser considerada na deflagração de mecanismos apoptóticos quando estes se encontram abaixo ou acima de seus limites fisiológicos (SEILER & RAUL, 2005).

Neste sentido, o aumento nas concentrações de putrescina em equinos expostos à sobrecarga de CHO deveria, de alguma forma, ser implicado no aumento das células apoptóticas detectado nestes animais (ver capítulo 3). Essa hipótese ganha força ao se comparar este aumento das concentrações de putrescina com aqueles dos eqüinos com laminite experimental tratados com solução tampão onde, embora não tenha sido bloqueado, foi bem menor do que no grupo sem tratamento tampão, guardando correlação estreita com o número de células apoptóticas (ver capítulo 3). Estes achados apontam diretamente para o envolvimento da putrescina no desencadeamento do processo apoptótico em células epidermais laminares de eqüinos com laminite experimental.

5.5. CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos conclui-se que:

1. A administração de sobrecarga de CHO induz aumento da produção de putrescina e cadaverina;
2. A administração de solução tampão em eqüinos com laminite induzida por sobrecarga de CHO diminuiu a intensidade da produção de putrescina induzida pelo CHO.
3. A sobrecarga de CHO não induziu aumento de aminas conhecidamente vasoativas.

5.6. REFERÊNCIAS⁵⁰

ARNOLD, S.H.; BROWN, W.D. Histamine toxicity from fish products. *Adv. Food Res.*, v.24, p.113-154, 1978.

BAILEY, S.R.; CUNNINGHAM, F.M.; ELLIOTT, J. Endotoxin and dietary amines may increase plasma 5-hydroxytryptamine in the horse. *Equine Vet. J.*, v.32, n.6, p.497-504, 2000.

BAILEY, S.R. et al. Amines from the equine hindgut may cause digital vasoconstriction by direct or indirect mechanisms. *J. Vet. Internal Med.*, v.15, n.3, p.379, 2001.

BAILEY, S.R.; RYCROFT, A.; ELLIOTT, J. Production of amines in equine cecal contents in an *in vitro* model of carbohydrate overload. *J. Anim. Sci.*, v.80, p.2656-2662, 2002.

BAILEY, S.R.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Identification and quantification of amines in the equine caecum. *Res. Vet. Sci.*, v.74, n.2, p.113-118, 2003.

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

BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER JW. Acid stress responses in enterobacteria *FEMS Microbiol Lett.*, v.47, n.2, p.173-180, 1997.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Aminoacid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, v.66, p.185-189, 2001.

ELLIOTT, J.; BERHANE, Y.; BAILEY, S.R. Effects of monoamines formed in the cecum of horses on equine digital blood vessels and platelets. *Am. J. Vet. Res.*, v.64, n.9, p.1124-1131, 2003.

⁵⁰ De acordo com as normas da ABNT NBB 6023, agosto de 2002

GARNER, H.E. et al. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet. J.*, v.10, p.249-252, 1978.

GOLOVNYA, R.V.; ZHURAVLEVA, I.L.; KHARATYAN, S.G. Gas chromatographic analysis of amines in volatile substances of *Streptococcus lactis*. *J. Chromatogr.*, v.44, p.262–268, 1969.

GRASSILLI, E. et al. Is polyamine decrease a common feature of apoptogenesis? Evidence from γ rays – and heat shock - induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v.216, p.708–714, 1995.

HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, v.5, p.42-49, 1994.

HILL, K.J.; MANGAN, J.L. The formation and distribution of methylamine in the ruminant digestive tract. *Biochem. J.*, v.93, p.39–45, 1964.

HILL, I.R.; KENWORTHY, R.; PORTER, P. Studies of the effect of dietary lactobacilli on intestinal and urinary amines in pigs in relation to weaning and post-weaning diarrhoea. *Res. Vet. Sci.*, v.11, p.320–326, 1970.

HOOD, D.M. et al. The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. *J. Vet. Intern Med.*, v.7, p.228-234, 1993.

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. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.1167-1172, 2001.

HURST, W.J. A review of HPLC methods for the determination of selected biogenic amines in food. *J. Liquid Chromatogr.*, v.13, n.1, p.1-23, 1990.

KIRSCHBAUM, J.; REBSCHER, K.; BRUCKNER, H. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatisation with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. *J. Chromatography*, v.881, p.517–530, 2000.

LEUSCHNER, R.G.K.; HAMMES, W.P. Formation of biogenic amine in mayonnaise, herring and tuna fish salad by lactobacilli. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, v.50, p.159–164, 1999.

LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. *Bol. S.B.C.T.A.*, v.33, n.1, p.70-79, 1999.

MCCABE, B.J. Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.86, p.1059–1064, 1986.

NAKAMURA, C. et al. Changes in intracellular concentrations of polyamines during apoptosis of HL-60 cells. *Anticancer Res.*, v.23, p.4797–4803, 2003.

PATEL, A.R.; WANG, J.Y. Polyamines modulate transcription but not posttranscription of c-myc and c-jun in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v.273, p.C1020–1029, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.M. Adrenergic transmission. In: *Pharmacology*, 2 ed. Churchill Livingstone, London, UK, p.212, 1991.

RICE, S.L.; KOEHLER, P.E. Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* species and the production of tyramine in fermented sausages. *J. Milk Food Technol.*, v.38, p.256–258, 1976.

SEILER, N.; RAUL, F. Polyamines and apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* v.9, n.3, p.623-642, 2005.

SOLANGE, C. et al. Bioactive Amines in Brazilian Wines: Types, Levels and Correlation with Physico-Chemical Parameters *Brazilian Archives of Biology and Technol.*, v.48, n.1, p.53-62, 2005.

VALE, S.R.; GLORIA, M.B. Determination of biogenic amines in cheese. *JAOAC. Int.*, v.80, n.5, p.1006-1012, 1997.

CAPÍTULO 6 – IMPLICAÇÕES

Este projeto foi idealizado pautado na experiência clínico-cirúrgica do professor Carlos Augusto Araújo Valadão nos atendimentos de rotina junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP-Jaboticabal. Tendo em vista a grande incidência de casos de laminite secundária às cirurgias gastrintestinais em eqüinos, observou-se que nos casos onde o conteúdo gastrointestinal apresentava caráter ácido e odor pútrido quando se realizava a enterotomia para o esvaziamento do cólon, existia maior frequência de laminite. Por outro lado, notou-se que os aspectos fermentativos desses quadros assemelhavam-se àquelas observadas no momento do esvaziamento rumenal nos casos de acidose láctica. Assim, nessa afecção as principais medidas referem-se à evacuação da ingesta e redução da acidose empregando-se laxativos alcalinos contendo hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio *in situ*, antes do fechamento do rúmen. Por associação imaginou-se que tal conduta poderia, também, ajudar a minimizar a ocorrência dessa terrível seqüela, a laminite. Dessa maneira, passou-se a empregar os antiácidos comerciais contendo hidróxidos de alumínio e de magnésio, diluídos em soro fisiológico imediatamente antes da enterorráfia do cólon. Os resultados clínicos foram os esperados reduzindo-se a incidência da laminite pós-cirúrgica naqueles eqüinos que recebiam o tamponamento.

A idéia de trabalhar com o tamponamento cecal em um modelo de laminite experimental surgiu então dessa experiência, centrada na necessidade de estabelecer uma correlação entre a função cecal na sobrecarga de grãos e a fisiopatogenia da laminite. Sabe-se que apesar da imensa quantidade de estudos envolvendo a fisiopatogenia e sintomas da laminite eqüina, inexistem informações precisas sobre a efetividade de um tratamento direcionado para o re-estabelecimento funcional do ceco eqüino, desde que se acredita este órgão peça-chave no desencadeamento da laminite alimentar.

Desta maneira, que ao tempo em que esse estudo esclarece aspectos importantes sobre a laminite induzida por sobrecarga de carboidratos, aponta também para novos caminhos para estudos futuros mostrando a necessidade da consolidação de parcerias entre centros de pesquisa nacionais e internacionais, cujo aspecto

multidisciplinar, propiciou a obtenção de resultados consistentes, nas diversas especialidades.

O primeiro objetivo foi padronizar a técnica de implantação das cânulas cecais, por colheu-se o material cecal, para a avaliação da ação direta do tratamento tampão no ceco. Estabeleceu-se procedimento invasivo cuja reação inflamatória, cicatrização e risco de infecção foram minimizados. Baseados em técnica previamente descrita para a canulação do cólon menor (LOPES, 2002), adaptou-se o procedimento para o ceco, gerando uma dissertação de mestrado intitulada “Descrição de uma técnica cirúrgica para canulação do ceco de eqüinos e avaliação das suas repercussões clínicas, hematológicas e peritoneais” elaborada pela pós-graduanda Andréa del Pilar Uribe, apresentada ao Programa de Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias UNESP, em 2004.

A canulação cecal mostrou exeqüível e os animais canulados eram mantidos estabulados até a completa cicatrização, não havendo nenhuma ocorrência de cólica até o final do período experimental, disponibilizando dessa maneira uma técnica modelo para o estudo dos distúrbios nutricionais e gastrintestinais na espécie eqüina, uma vez que possibilita inúmeras análises a partir da canulação. Nesse ínterim, em congresso realizado na FCAV (Ciclo Internacional de Cólica Eqüina) o projeto foi discutido com o Dr. Rustin M. Moore, pesquisador da laminite eqüina, quando ficou acordado a sua co-orientação em doutorado sanduíche na School of Veterinary Medicine da Louisiana State University, para realizar parte das análises do material laminar. Durante o doutorado sanduíche foram realizadas partes importantes desse estudo e outras análises do material colhido das lâminas do casco dos cavalos. Com o desenrolar dos procedimentos laboratoriais à medida que o material era processado, os resultados preliminares obtidos eram divulgados em congressos nacionais e internacionais, ocorrendo boa aceitação e reconhecimento de bom nível no VIII Congresso do Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária (SOUZA et al., 2006a), no VIII International Equine Colic Research Symposium (SOUZA et al., 2005) e na 52th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (SOUZA et al., 2006b).

O atraso nos sinais de claudicação em eqüinos com laminite experimental induzida com sobrecarga de CHO tratados com solução tampão, pode ser considerada

promissora, pois, demonstra que apesar de não prevenir completamente as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas induzida pelo CHO, essa solução diminuiu a intensidade dessas alterações. Muito embora, normalmente, os cavalos acometidos por laminite só sejam identificados após o surgimento dos sinais clínicos, ou seja, após a fase prodrômica, onde os danos poderiam ser ainda evitados, nos casos de sobrecarga de grãos, flagrados em seu início poderão ser tratados na tentativa de minimizar possíveis danos laminar.

Mais do que encontrar uma medida terapêutica de aplicação imediata, estes achados acrescentam mais algumas peças no complexo quebra-cabeça que constitui a fisiopatologia da laminite, com o propósito de ajudar a desvendar alguns dos diferentes mecanismos envolvidos nessa doença. Dessa maneira, o grande número de células apoptóticas na camada basal, aponta que esse mecanismo possa ser uma das causas da falência estrutural digital. A identificação de aminas biogênicas, no conteúdo cecal *in vivo*, confirma os dados de outros pesquisadores que observaram este tipo de alteração em modelos *in vitro*, mostrando que mesmo diante da variação individual das respostas foi possível replicar dados obtidos sob condições controladas. Por sua vez, a maior expressão gênica da enzima MMP-9 em relação à MMP-2 pode ser uma evidência de um papel diferenciado dessa enzima no desencadeamento da laminite eqüina. De certo, a análises de amostras microbiológicas, dos ácidos graxos voláteis e das alterações da mucosa cecal ainda não concluídas poderão acrescentar mais informações neste mosaico da fisiopatologia da laminite eqüina.

De maneira geral, a análise dos resultados obtidos com a realização deste projeto aponta que a administração intracecal de solução tampão composta por $\text{Al}(\text{OH})_3$ e $\text{Mg}(\text{OH})_2$ foi eficaz na redução dos efeitos deletérios da fermentação do carboidrato no ceco no entanto, face a ausência de estudos anteriores, deve-se pensar na realização de novas investigações envolvendo o esquema posológico, concentração da solução e via de administração para alicerçar o potencial terapêutico do uso do tamponamento cecal na prevenção da laminite clínica, principalmente, devido à sobrecarga de grãos.

REFERÊNCIAS

LOPES, M.A. et al. Effects of feeding large amounts of grain on colonic contents and feces in horses *Am. J. Vet. Res.*, v.;65; n.5, p.687-694, 2004.

SOUZA, A.H. et al. Effects of aluminum hydroxide/magnesium hydroxide antacid on clinical signs, and blood and peritoneal fluids hematologica and biochemical alterations in horses with experimental laminitis induced by carbohydrate overload. *Proc. 8th International Equine Colic Research Symposium*, p.14-16, 2005.

SOUZA, A.H. et al. Apoptose de células epidermais lamelares na laminite induzida por sobrecarga de carboidrato, após tamponamento cecal, em equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.58, supl.2, p.77, 2006a.

SOUZA, A.H. et al. Transcription of MMP-2 and MMP-9 in horses with CHO induced laminitis treated with an intracecal buffering solution. *AAEP 52nd Ann. Conv. Proc.*, v.52, p.540-541, 2006b.

APÊNDICES

Tabela 1 – Média e desvio padrão da pressão arterial média (mmHg) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 104 ^a [16] | 93 ^a [10] | 95 ^a [5] | 85 ^a [21] | 101 ^a [7] |
| GCS | 107 ^a [15] | 98 ^a [14] | 90 ^a [10] | 99 ^a [20] | 116 ^a [18] |
| GCT | 95 ^a [26] | 88 ^a [12] | 85 ^a [19] | 98 ^a [23] | 117 ^a [34] |
| GAT | 101 ^a [7] | 103 ^a [16] | 105 ^a [11] | 96 ^a [19] | 104 ^a [23] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da frequência respiratória (movimento/minuto) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 11 ^a [3] | 21 ^a [12] | 19 ^a [14] | 15 ^a [8] | 17 ^a [5] |
| GCS | 16 ^a [5] | 22 ^a [5] | 15 ^a [3] | 20 ^a [9] | 25 ^a [15] |
| GCT | 20 ^a [7] | 28 ^a [11] | 24 ^a [10] | 15 ^a [6] | 24 ^a [11] |
| GAT | 13 ^a [3] | 22 ^a [16] | 15 ^a [4] | 14 ^a [7] | 13 ^a [5] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 3 – Média e desvio padrão de neutrófilos bastonetes ($\times 10^3/\mu\text{l}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,03 ^a [0,06] | 0,00 ^a [0,00] | 0,06 ^a [0,04] |
| GCS | 0,08 ^a [0,04] | 0,03 ^a [0,06] | 0,13 ^a [0,06] | 0,09 ^a [0,05] | 0,08 ^a [0,07] |
| GCT | 0,05 ^a [0,07] | 0,03 ^a [0,06] | 0,07 ^a [0,08] | 0,24 ^a [0,13] | 0,13 ^a [0,19] |
| GAT | 0,00 ^a [0,00] | 0,04 ^a [0,04] | 0,00 ^a [0,0] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 4 – Média e desvio padrão de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,0] | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] | 0,0 ^a [0,0] |
| GCS | 0,1 ^a [0,1] | 0,2 ^a [0,2] | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] |
| GCT | 0,1 ^a [0,2] | 0,1 ^a [0,1] | 0,2 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] |
| GAT | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,0] | 0,1 ^a [0,0] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 5 – Média e desvio padrão de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 3,1 ^a [0,7] | 3,6 ^a [0,9] | 3,5 ^a [0,8] | 3,4 ^a [1,0] | 3,3 ^a [0,9] |
| GCS | 3,4 ^a [0,7] | 3,9 ^a [0,8] | 2,7 ^a [1,4] | 2,4 ^a [1,5] | 2,9 ^a [1,9] |
| GCT | 3,6 ^a [0,8] | 4,1 ^a [0,6] | 3,1 ^a [0,5] | 2,0 ^a [0,6] | 1,9 ^a [1,0] |
| GAT | 3,5 ^a [1,0] | 3,9 ^a [1,2] | 3,4 ^a [0,6] | 3,2 ^a [1,3] | 4,1 ^a [0,8] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 6 – Média e desvio padrão de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,3 ^a [0,3] | 0,2 ^a [0,3] | 0,2 ^a [0,2] | 0,2 ^a [0,2] | 0,3 ^a [0,3] |
| GCS | 0,2 ^a [0,2] | 0,1 ^a [0,2] | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] |
| GCT | 0,1 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] | 0,0 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,2] | 0,1 ^a [0,1] |
| GAT | 0,2 ^a [0,2] | 0,2 ^a [0,2] | 0,1 ^a [0,2] | 0,2 ^a [0,1] | 0,1 ^a [0,1] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 7 – Média e desvio padrão de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) em equinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,00 ^a [0,00] | 0,08 ^a [0,05] | 0,00 ^a [0,00] | 0,02 ^a [0,04] | 0,03 ^a [0,05] |
| GCS | 0,04 ^a [0,05] | 0,06 ^a [0,08] | 0,06 ^a [0,08] | 0,00 ^a [0,00] | 0,03 ^a [0,06] |
| GCT | 0,04 ^a [0,06] | 0,07 ^a [0,07] | 0,07 ^a [0,09] | 0,02 ^a [0,05] | 0,00 ^a [0,00] |
| GAT | 0,03 ^a [0,05] | 0,02 ^a [0,04] | 0,00 ^a [0,00] | 0,05 ^a [0,05] | 0,00 ^a [0,00] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 8 – Média e desvio padrão do teor de proteínas plasmáticas (g/dL) em equinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 7,5 ^a [0,7] | 7,3 ^a [0,4] | 7,8 ^a [0,2] | 7,4 ^a [0,5] | 7,5 ^a [0,6] |
| GCS | 7,0 ^a [0,7] | 7,1 ^a [1,0] | 6,8 ^a [1,1] | 7,4 ^a [0,8] | 7,7 ^a [0,4] |
| GCT | 7,5 ^a [0,6] | 7,4 ^a [0,6] | 7,6 ^a [0,6] | 7,5 ^a [0,9] | 8,1 ^a [0,7] |
| GAT | 7,8 ^a [0,7] | 7,7 ^a [0,6] | 7,8 ^a [0,9] | 7,9 ^a [0,6] | 8,0 ^a [0,6] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 9 – Média e desvio padrão do teor de glicose sanguínea (mg/dL) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 69,0 ^a [9,5] | 75,7 ^a [6,3] | 78,2 ^a [8,5] | 82,8 ^a [7,9] | 87,2 ^a [11,7] |
| GCS | 74,5 ^a [10,2] | 87,6 ^a [32,2] | 77,3 ^a [17,3] | 92,9 ^a [8,5] | 119,1 ^a [42,0] |
| GCT | 71,6 ^a [9,1] | 86,5 ^a [26,0] | 80,2 ^a [14,6] | 85,6 ^a [20,2] | 115,7 ^a [20,9] |
| GAT | 69,4 ^a [4,8] | 70,0 ^a [11,5] | 81,6 ^a [8,4] | 90,7 ^a [12,5] | 95,2 ^a [22,4] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 10 – Média e desvio padrão do teor de fibrinogênio sanguíneo (mg/dL) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 160,6 ^a [46,7] | 151,4 ^a [44,4] | 158,6 ^a [40,4] | 148,0 ^a [32,1] | 167,0 ^a [43,0] |
| GCS | 134,2 ^a [30,2] | 137,5 ^a [33,7] | 142,5 ^a [36,4] | 149,2 ^a [36,3] | 192,0 ^a [63,8] |
| GCT | 140,7 ^a [69,5] | 150,3 ^a [63,9] | 158,2 ^a [82,7] | 187,7 ^a [94,3] | 208,0 ^a [65,7] |
| GAT | 137,5 ^a [13,3] | 136,7 ^a [8,8] | 140,8 ^a [20,4] | 159,2 ^a [25,6] | 176,7 ^a [45,4] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 11 – Média e desvio padrão da enzima AST plasmática (U/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 217,9 ^a [35,0] | 215,8 ^a [36,5] | 228,4 ^a [37,7] | 220,0 ^a [41,1] | 226,3 ^a [53,8] |
| GCS | 201,7 ^a [44,5] | 226,1 ^a [46,9] | 224,4 ^a [42,7] | 225,2 ^a [51,6] | 255,7 ^a [95,5] |
| GCT | 205,2 ^a [55,8] | 213,9 ^a [59,5] | 216,5 ^a [56,8] | 218,3 ^a [58,3] | 272,9 ^a [87,8] |
| GAT | 217,8 ^a [49,2] | 222,6 ^a [40,1] | 237,4 ^a [54,3] | 234,0 ^a [46,8] | 238,3 ^a [49,0] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 12 – Média e desvio padrão da enzima CK plasmática (U/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 257,4 ^a [32,5] | 238,0 ^a [49,7] | 233,1 ^a [44,1] | 233,2 ^a [36,8] | 242,9 ^a [17,1] |
| GCS | 271,2 ^a [78,9] | 279,3 ^a [87,9] | 259,1 ^a [87,8] | 275,2 ^a [99,1] | 228,3 ^a [55,9] |
| GCT | 206,5 ^a [45,5] | 242,9 ^a [95,9] | 222,6 ^a [64,1] | 210,5 ^a [45,2] | 174,9 ^a [52,7] |
| GAT | 255,0 ^a [59,0] | 325,8 ^a [102,6] | 307,6 ^a [74,7] | 380,4 ^a [216,0] | 295,5 ^a [80,4] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 13 – Média e desvio padrão do teor da enzima FA sangüínea (U/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 209,0 ^a [40,4] | 202,4 ^a [36,4] | 205,6 ^a [41,2] | 200,7 ^a [35,4] | 202,3 ^a [40,5] |
| GCS | 168,6 ^a [12,5] | 163,8 ^a [18,9] | 178,3 ^a [15,5] | 175,5 ^a [29,9] | 172,5 ^a [31,2] |
| GCT | 161,7 ^a [24,5] | 156,2 ^a [19,9] | 155,8 ^a [17,7] | 172,7 ^a [21,3] | 188,2 ^a [21,1] |
| GAT | 169,3 ^a [48,4] | 176,9 ^a [53,4] | 181,0 ^a [67,7] | 170,7 ^a [53,1] | 175,5 ^a [55,8] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 14 – Média e desvio padrão do sódio sangüíneo (mmol/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 134,6 ^a [0,8] | 131,2 ^a [5,0] | 134,3 ^a [1,7] | 134,4 ^a [3,2] | 135,4 ^a [3,3] |
| GCS | 131,4 ^a [9,0] | 134,0 ^a [5,9] | 133,4 ^a [3,0] | 130,2 ^a [8,3] | 128,8 ^a [3,0] |
| GCT | 133,8 ^a [5,0] | 134,3 ^a [4,8] | 137,3 ^a [3,9] | 137,1 ^a [3,4] | 129,4 ^a [4,4] |
| GAT | 132,1 ^a [3,2] | 130,9 ^a [5,6] | 134,2 ^a [3,2] | 132,8 ^a [4,2] | 135,3 ^a [3,5] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 15 – Média e desvio padrão do potássio sanguíneo (mmol/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 4,1 ^a [0,3] | 4,7 ^a [0,3] | 4,7 ^a [0,1] | 4,1 ^a [0,3] | 4,1 ^a [0,8] |
| GCS | 4,3 ^a [0,6] | 4,6 ^a [0,4] | 4,4 ^a [0,9] | 3,7 ^a [0,4] | 3,9 ^a [0,9] |
| GCT | 4,1 ^a [0,3] | 4,8 ^a [0,9] | 4,7 ^a [1,1] | 3,7 ^a [0,5] | 3,5 ^a [0,4] |
| GAT | 3,7 ^a [0,5] | 4,3 ^a [0,2] | 4,5 ^a [0,6] | 4,0 ^a [0,3] | 3,7 ^a [0,2] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).]

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 16 – Média e desvio padrão do cálcio sanguíneo (mmol/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,0] |
| GCS | 1,4 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,0] | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,1] |
| GCT | 1,5 ^a [0,0] | 1,5 ^a [0,0] | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,2] |
| GAT | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,0] | 1,5 ^a [0,0] | 1,5 ^a [0,1] | 1,5 ^a [0,0] |

Letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).]

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 17 – Média e desvio padrão do NO sangüíneo ($\mu\text{g/ml}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 42,2 ^a [32,1] | 48,2 ^a [34,4] | 53,5 ^a [20,5] | 42,4 ^a [20,6] | 38,8 ^a [37,2] |
| GCS | 135,6 ^a [111,2] | 267,2 ^a [301,3] | 223,1 ^a [123,6] | 250,0 ^a [150,1] | 113,1 ^a [77,6] |
| GCT | 115,7 ^a [137,9] | 227,0 ^a [157,7] | 174,4 ^a [180,6] | 199,5 ^a [133,3] | 125,9 ^a [86,7] |
| GAT | 159,7 ^a [208,4] | 52,4 ^a [29,9] | 117,5 ^a [107,7] | 60,3 ^a [35,1] | 32,4 ^a [25,7] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 18 – Média e desvio padrão do NO peritoneal ($\mu\text{g/ml}$) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 60,4 ^a [34,0] | 56,2 ^a [31,5] | 54,8 ^a [32,0] | 81,6 ^a [89,1] | 62,0 ^a [19,3] |
| GCS | 174,8 ^a [99,7] | 293,9 ^a [298,3] | 241,3 ^a [141,2] | 228,1 ^a [203,3] | 168,6 ^a [108,8] |
| GCT | 211,1 ^a [111,3] | 268,7 ^a [153,1] | 387,2 ^a [299,5] | 258,4 ^a [183,8] | 135,2 ^a [39,1] |
| GAT | 52,8 ^a [20,3] | 59,5 ^a [36,7] | 71,4 ^a [77,9] | 80,8 ^a [78,1] | 71,0 ^a [52,2] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 19 – Média e desvio padrão do teor do fibrinogênio peritoneal (mg/dL) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 7,4 ^a [0,6] | 8,5 ^a [2,0] | 8,2 ^a [1,3] | 7,3 ^a [0,5] | 8,0 ^a [1,1] |
| GCS | 7,2 ^a [0,8] | 7,2 ^a [0,8] | 7,0 ^a [0,5] | 6,9 ^a [0,3] | 10,6 ^a [6,9] |
| GCT | 6,8 ^a [0,0] | 6,8 ^a [0,0] | 7,3 ^a [1,3] | 7,7 ^a [1,2] | 7,9 ^a [1,7] |
| GAT | 7,5 ^a [1,2] | 7,3 ^a [0,9] | 7,9 ^a [1,8] | 8,5 ^a [2,7] | 9,0 ^a [3,3] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 20 – Média e desvio padrão do teor de proteínas totais peritoneais (g/dL) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 2,1 ^a [0,7] | 1,8 ^a [0,5] | 1,8 ^a [0,4] | 1,8 ^a [0,4] | 1,8 ^a [0,5] |
| GCS | 1,4 ^a [0,6] | 1,4 ^a [0,5] | 1,7 ^a [0,8] | 2,3 ^a [1,1] | 2,4 ^a [1,0] |
| GCT | 1,3 ^a [0,3] | 1,4 ^a [0,3] | 1,5 ^a [0,4] | 2,3 ^a [0,5] | 3,0 ^a [0,9] |
| GAT | 1,8 ^a [0,6] | 1,9 ^a [0,9] | 2,0 ^a [0,9] | 2,0 ^a [1,0] | 2,2 ^a [1,1] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 21 – Média e desvio padrão da enzima AST peritoneal (U/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 65,99 ^a [29,75] | 59,71 ^a [19,46] | 58,66 ^a [15,00] | 63,90 ^a [18,30] | 62,70 ^a [15,00] |
| GCS | 47,14 ^a [20,95] | 44,00 ^a [17,22] | 60,76 ^a [28,83] | 73,33 ^a [36,48] | 70,70 ^a [38,83] |
| GCT | 44,52 ^a [23,37] | 46,27 ^a [21,32] | 53,25 ^a [18,27] | 72,28 ^a [27,55] | 107,34 ^a [54,69] |
| GAT | 52,38 ^a [22,71] | 60,23 ^a [34,54] | 65,48 ^a [36,11] | 67,23 ^a [39,27] | 79,62 ^a [43,42] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 22 – Média e desvio padrão da enzima CK peritoneal (U/L) em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 48,5 ^a [0,0] | 52,2 ^a [11,8] | 58,2 ^a [13,3] | 58,2 ^a [13,3] | 63,1 ^a [32,6] |
| GCS | 63,1 ^a [21,7] | 58,3 ^a [21,7] | 63,1 ^a [21,7] | 102,0 ^a [71,6] | 115,4 ^a [75,2] |
| GCT | 48,6 ^a [15,4] | 85,0 ^a [62,9] | 97,1 ^a [55,4] | 72,9 ^a [17,2] | 87,4 ^a [36,8] |
| GAT | 64,7 ^a [12,5] | 60,7 ^a [13,3] | 64,7 ^a [12,5] | 56,6 ^a [12,5] | 72,8 ^a [29,7] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 23 – Média e desvio padrão da densidade do líquido peritoneal em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 1,016 ^a [0,002] | 1,016 ^a [0,002] | 1,016 ^a [0,002] | 1,016 ^a [0,002] | 1,017 ^a [0,002] |
| GCS | 1,014 ^a [0,002] | 1,015 ^a [0,001] | 1,016 ^a [0,001] | 1,019 ^a [0,004] | 1,021 ^a [0,004] |
| GCT | 1,016 ^a [0,004] | 1,017 ^a [0,004] | 1,017 ^a [0,005] | 1,018 ^a [0,005] | 1,019 ^a [0,006] |
| GAT | 1,015 ^a [0,003] | 1,014 ^a [0,001] | 1,015 ^a [0,003] | 1,019 ^a [0,005] | 1,020 ^a [0,006] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 24 – Média e desvio padrão do pH do líquido peritoneal em eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 7,50 ^a [0,50] | 7,50 ^a [0,50] | 7,50 ^a [0,50] | 7,50 ^a [0,50] | 7,40 ^a [0,55] |
| GCS | 7,25 ^a [0,76] | 7,20 ^a [0,45] | 7,00 ^a [0,71] | 7,00 ^a [1,22] | 7,40 ^a [1,08] |
| GCT | 6,87 ^a [0,55] | 7,00 ^a [0,45] | 6,92 ^a [0,49] | 7,25 ^a [0,42] | 7,00 ^a [0,61] |
| GAT | 7,20 ^a [0,57] | 7,20 ^a [0,45] | 7,20 ^a [0,57] | 7,20 ^a [0,45] | 7,00 ^a [0,82] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 25 – Média e desvio padrão da concentração de timina ($\mu\text{g/mL}$) obtidos em conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,09 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 1,65 ^a [0,00] | 1,18 ^a [0,00] |
| GCS | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,37 ^a [1,48] |
| GCT | 0,06 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,07] |
| GAT | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 26 – Média e desvio padrão da concentração de serotonina ($\mu\text{g/mL}$) obtidos em conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,03 ^a [0,05] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,24 ^a [0,38] | 0,39 ^a [0,58] |
| GCS | 0,01 ^a [0,02] | 0,00 ^a [0,00] | 0,04 ^a [0,09] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] |
| GCT | 0,04 ^a [0,09] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] |
| GAT | 0,04 ^a [0,08] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 27 – Média e desvio padrão da concentração de agmatina ($\mu\text{g/mL}$) obtidos em conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,02 ^a [0,03] | 0,00 ^a [0,01] | 0,00 ^a [0,00] | 0,09 ^a [0,10] | 0,03 ^a [0,05] |
| GCS | 0,08 ^a [0,14] | 0,17 ^a [0,32] | 0,12 ^a [0,13] | 0,27 ^a [0,48] | 0,11 ^a [0,24] |
| GCT | 0,00 ^a [0,00] | 0,28 ^a [0,37] | 0,30 ^a [0,44] | 0,10 ^a [0,21] | 0,02 ^a [0,03] |
| GAT | 0,12 ^a [0,26] | 0,04 ^a [0,06] | 0,04 ^a [0,08] | 0,01 ^a [0,03] | 0,14 ^a [0,29] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 28 – Média e desvio padrão da concentração de espermidina ($\mu\text{g/mL}$) obtidos em conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,40 ^a [0,03] | 0,15 ^a [0,25] | 0,57 ^a [0,43] | 0,84 ^a [0,17] | 0,53 ^a [0,57] |
| GCS | 0,59 ^a [0,39] | 0,45 ^a [0,30] | 0,59 ^a [0,72] | 0,57 ^a [0,43] | 0,59 ^a [0,47] |
| GCT | 0,27 ^a [0,23] | 0,27 ^a [0,26] | 0,41 ^a [0,56] | 1,05 ^a [1,04] | 0,31 ^a [0,35] |
| GAT | 0,46 ^a [0,45] | 0,35 ^a [0,30] | 0,17 ^a [0,13] | 0,31 ^a [0,21] | 0,64 ^a [0,47] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 29 – Média e desvio padrão da concentração de feniletilamina ($\mu\text{g/mL}$) obtidos em conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,06 ^a [0,10] | 0,00 ^a [0,00] | 0,02 ^a [0,03] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] |
| GCS | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,05 ^a [0,12] | 0,08 ^a [0,12] |
| GCT | 0,02 ^a [0,04] | 0,03 ^a [0,07] | 0,01 ^a [0,02] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] |
| GAT | 0,04 ^a [0,10] | 0,00 ^a [0,00] | 0,06 ^a [0,09] | 0,05 ^a [0,08] | 0,00 ^a [0,00] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.

Tabela 30 – Média e desvio padrão da concentração de histamina ($\mu\text{g/mL}$) obtidos em conteúdo cecal de eqüinos dos grupos GAS (controle), GCS (controle CHO), GCT (CHO-tampão), GAT (controle tampão) ao longo de 48 horas após a indução da laminite por sobrecarga de CHO.

| GRUPOS | Basal | Tempo após administração do CHO (h) | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 | 12 | 24 | 48 |
| GAS | 0,07 ^a [0,13] | 0,00 ^a [0,00] | 0,00 ^a [0,00] | 0,12 ^a [0,20] | 0,07 ^a [0,12] |
| GCS | 0,26 ^a [0,52] | 0,04 ^a [0,06] | 0,05 ^a [0,09] | 0,25 ^a [0,29] | 0,12 ^a [0,18] |
| GCT | 0,17 ^a [0,41] | 0,10 ^a [0,11] | 0,16 ^a [0,25] | 0,34 ^a [0,35] | 0,09 ^a [0,13] |
| GAT | 0,24 ^a [0,33] | 0,20 ^a [0,45] | 0,03 ^a [0,05] | 0,03 ^a [0,06] | 0,13 ^a [0,25] |

letra distinta denota diferença entre os grupos (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

* diferente do valor basal; [] desvio padrão.