

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Antônio Catunda Pinho Neto

**IMUNOLocalização de Proteínas que Participam da Sinalização
Intracelular no Tecido Lamelar de Cavalos Submetidos ao
Modelo de Indução de Laminite Oligofrutose**

Belo Horizonte
2023

Antônio Catunda Pinho Neto

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE PARTICIPAM DA SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR NO TECIDO LAMELAR DE CAVALOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE INDUÇÃO DE LAMINITE OLIGOFRUTOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Resende Faleiros

Coorientador:

Prof. Dr. Armando de Mattos Carvalho

Profa. Dra. Britta Sigrid Leise

Belo Horizonte

2023

P654i Pinho Neto, Antônio Catunda, 1983-
Imunolocalização de proteínas que participam da sinalização intracelular no tecido lamelar submetido ao modelo de indução de laminite por oligofrutose / Antônio Catunda Pinho Neto. – 2023.

104 f.
Inclui bibliografia: f. 96-104.

Orientador: Rafael Resende Faleiros.
Coorientadora: Britta Sigrid Leise.

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

1- Equino - doenças – Teses. 2- Laminite – Teses. I – Faleiros, Rafael Resende. II – Leise, Britta Sigrid. III – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V - Título.

CDD – 636.08

Bibliotecário responsável Wellington Marçal de Carvalho – CRB6/2303



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE TESE - ANTÔNIO CATUNDA PINHO NETO

Às 08:00 horas do dia 02 de maio de 2023, reuniu-se, na Escola de Veterinária UFMG a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado dos Cursos em 15/02/2022, para julgar em exame final, a defesa da tese intitulada:

“IMUNOLocalização de Proteínas que Participam da Sinalização Intracelular no Tecido Lamelar de Equinos Submetidos ao Modelo de Indução de Laminite por Oligofrutose”

como requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência Animal, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Rafael Resende Faleiros**, após informar aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da Tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Rafael Resende Faleiros	X	
Leonardo Rodrigues de Lima	X	
Rodrigo Martins Ribeiro	x	
Paulo Ricardo de Oliveira Paes	X	
Rodrigo dos Santos Horta	x	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	X	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da Tese, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de aceite de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado do Curso. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 02 de maio de 2023.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Resende Faleiros, Professor do Magistério Superior**, em 30/05/2023, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo dos Santos Horta, Servidor(a)**, em 01/06/2023, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Martins Ribeiro, Usuário Externo**, em 13/06/2023, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Rodrigues de Lima, Usuário Externo**, em 19/07/2023, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Ricardo de Oliveira Paes, Professor do Magistério Superior**, em 14/09/2023, às 08:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2254147** e o código CRC **9151A719**.

Dedico esta Tese à Deus, a minha esposa Heloísa de Paula Pedroza, aos meus pais Francisco Freitas Carvalho e Vanda Manley Catunda Carvalho, as minhas irmãs Camila Manley Catunda Carvalho e Morgana Manley Catunda Carvalho e minha sobrinha Gabriela Mora Manley pelo amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha gratidão a Deus por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho. Agradeço também por ter colocado a Heloísa na minha vida, que tem sido uma parceira e um grande apoio.

Quero agradecer de coração à minha esposa, Heloísa de Paula Pedroza, por partilhar sua vida comigo e ser meu alicerce. Depois de todos esses anos juntos, só tenho a agradecer por todo o amor que você me deu. Você é uma pessoa muito especial na minha vida e sou eternamente grato por tudo o que faz por mim.

Gostaria de mencionar meu cachorro, Jon Snow, por sempre deixar minha vida menos monótona e me fazer companhia nos momentos difíceis.

Agradeço de todo coração ao meu pai, Francisco Freitas Carvalho, e à minha mãe, Vanda Manley Catunda Carvalho, por todo o amor incondicional, pelos incentivos e pela ajuda nos momentos difíceis. Vocês são a base da minha vida e sou muito grato por ter pais tão incríveis como vocês.

Quero agradecer às minhas irmãs, Camila Manley Catunda Carvalho e Morgana Manley Catunda Carvalho, por compreenderem a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. Agradeço também à minha sobrinha linda, Gabriela Mora Manley, por ser uma fonte de alegria e inspiração.

Quero expressar minha gratidão ao meu cunhado, Mário Mora, por cuidar tão bem da minha irmã e da minha sobrinha.

Agradeço também ao Sr. João, por me acolher tão bem em Minas Gerais. Uma figura carismática, sempre muito prestativa. Sou eternamente grato!

Gostaria de agradecer a todos os professores que me ajudaram ao longo da minha jornada acadêmica, desde o meu início na escola até a minha formação como doutor na UFMG. Obrigado por todos os ensinamentos e por acreditarem em mim.

Agradeço também aos meus coorientadores, Dr. Armando de Mattos Carvalho e Dra. Britta Sigrid Leise, pela orientação e aprendizado. Quero agradecer especialmente ao meu orientador, Dr. Rafael Resende Faleiros, que apesar da intensa rotina, me aceitou como orientado e me trouxe contribuições valiosas durante todo esse processo. Você é fonte de inspiração. Sou seu fã e amigo!

Quero agradecer ao meu amigo e professor, Geraldo Eleno, e sua esposa, Lúcia, pelas excelentes conversas e encontros para degustar vinhos e pratos deliciosos.

À minha família nos Estados Unidos, Rafael, Edivânia e Thiago Faleiros, por terem me acolhido em outro país e proporcionado uma experiência única na minha vida. Agradeço por terem compartilhado momentos inesquecíveis e me mostrado a cultura e a beleza desse país.

Aos médicos veterinários do Western Veterinary Hospital, Dr. Aloísio Bueno, Dr. Gary Hodges e Dra. Carol Akers, pela oportunidade de aprendizado e vivência em outra realidade profissional. Agradeço também à equipe técnica de enfermeiros do hospital, Nathalie, Gail, Bianca e outros, pela atenção e cuidado com os animais e comigo durante o estágio.

Aos meus amigos de Fortaleza, Thiago, Marcelo e Léo, por nunca terem deixado nossa amizade esfriar mesmo com a distância e por sempre me apoiarem em meus projetos pessoais e profissionais.

Às amizades que construí em Minas Gerais, Leticia Cota, Bruno Malacarne, Lucas Antunes, Marina Alcantara, Diego Varela, Isabella, Jorge, Lara, Adriano, Santiago, Felipe e outros, por terem compartilhado momentos incríveis e por terem me ajudado a crescer e evoluir pessoal e profissionalmente. Agradeço por suas amizades sinceras e enriquecedoras.

Aos funcionários da escola de veterinária da UFMG, Carlão, sr. Márcio, Luiz da patologia, Dário entre outros. Pessoas que sou grato pelos momentos de descontração e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Ao sr. Milton Cheib, pelo excelente trabalho de adestramento com meu cachorro, Jon Snow, tornando-o um campeão. Agradeço por sua dedicação e cuidado com meu companheiro de quatro patas.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

RESUMO GERAL

A laminite em equinos continua sendo um desafio terapêutico devido à escassez de opções eficazes para prevenção e tratamento, apesar dos esforços para compreender sua patofisiologia. Este estudo investigou a expressão de várias proteínas, incluindo Rictor, Raptor, p-STAT3, p-RPS6 e calprotectina, para identificar possíveis alvos terapêuticos. Amostras de tecido lamelar de equinos com laminite induzida por oligofrutose foram analisadas, revelando correlações significativas entre as proteínas inflamatórias calprotectina e p-STAT3, bem como entre essas e p-RPS6. A análise revelou correlações robustas entre calprotectina e p-STAT3 em diferentes camadas do tecido lamelar, indicando uma associação direta entre inflamação e ativação de vias de sinalização celular. Além disso, observou-se uma correlação positiva entre p-RPS6 e calprotectina, sugerindo uma interação entre inflamação e fosforilação de RPS6, uma proteína-chave na via mTOR. A associação entre Raptor e p-RPS6, p-STAT3 e calprotectina na sublamela sugere a participação da via mTOR na patogênese da laminite, especialmente considerando sua relação com a inflamação induzida pela interleucina-6 (IL-6), um fator conhecido por desempenhar um papel crucial na resposta inflamatória. Esses resultados sugerem que a ativação das vias mTOR/RPS6 e IL-6/gp130 pode ser fundamental na progressão da laminite relacionada à sepse em equinos. Essas descobertas destacam o potencial das vias celulares mTOR/RPS6 e IL-6/gp130 como alvos terapêuticos na laminite equina. Ao compreender as interações entre proteínas-chave e vias de sinalização, abre-se a possibilidade de desenvolver estratégias terapêuticas direcionadas para modular esses processos e mitigar os efeitos da laminite associada à sepse em equinos. Essa pesquisa oferece insights valiosos para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e específicos para a laminite em equinos, visando não apenas mitigar a inflamação e os danos teciduais, mas também preservar a integridade estrutural e funcional do tecido lamelar, melhorando assim o prognóstico e a qualidade de vida desses animais.

Palavras-Chave: Sinalização; mTOR; RPS6; STAT3; Calprotectina.

ABSTRACT

Laminitis in horses remains a therapeutic challenge due to the scarcity of effective options for prevention and treatment, despite efforts to understand its pathophysiology. This study investigated the expression of various proteins, including Rictor, Raptor, p-STAT3, p-RPS6, and calprotectin, to identify potential therapeutic targets. Lamellar tissue samples from horses with oligofructose-induced laminitis were analyzed, revealing significant correlations between the inflammatory proteins calprotectin and p-STAT3, as well as between these and p-RPS6. The analysis showed robust correlations between calprotectin and p-STAT3 in different layers of lamellar tissue, indicating a direct association between inflammation and activation of cellular signaling pathways. Furthermore, a positive correlation was observed between p-RPS6 and calprotectin, suggesting an interaction between inflammation and RPS6 phosphorylation, a key protein in the mTOR pathway. The association between Raptor and p-RPS6, p-STAT3, and calprotectin in the sublamella suggests the involvement of the mTOR pathway in the pathogenesis of laminitis, especially considering its relationship with interleukin-6 (IL-6)-induced inflammation, a factor known to play a crucial role in the inflammatory response. These results suggest that the activation of the mTOR/RPS6 and IL-6/gp130 pathways may be critical in the progression of sepsis-related laminitis in horses. These findings highlight the potential of the mTOR/RPS6 and IL-6/gp130 cellular pathways as therapeutic targets in equine laminitis. By understanding the interactions between key proteins and signaling pathways, there is an opportunity to develop targeted therapeutic strategies to modulate these processes and mitigate the effects of sepsis-associated laminitis in horses. This research offers valuable insights for the development of more effective and specific treatments for laminitis in horses, aiming not only to mitigate inflammation and tissue damage but also to preserve the structural and functional integrity of lamellar tissue, thereby improving the prognosis and quality of life of these animals.

Keywords: Signaling; mTOR; RPS6; STAT3; Calprotectin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Características dos quatro graus de Obel usados para definir claudicação relacionada a laminite (OBEL, 1948).	32
Quadro 2 - Anticorpos utilizados para imunistoquímica de p-RPS6 (ser235/236; ser240244), Rictor, Raptor e o anticorpo secundário.	56
Figura 1 - Esquema evolutivo de 55 milhões de anos do cavalo. O período Eoceno demonstra o ancestral primitivo (<i>Hyracotherium</i>). Um animal pequeno, aproximadamente do tamanho de um cão de pequeno porte, contendo dentes de coroa curta, adaptados a maceração de folhas macias e altamente nutritivas. Note também que esse animal apresentava 4 dígitos. No período Oligoceno surge o <i>Meshippus</i> . Um animal um pouco maior com apoio ao solo em três dígitos. Posteriormente, aparece o <i>Merychippus</i> , com três dígitos, porém apoiado apenas no dedo médio. No período Pleistoceno surge o <i>Equus caballus</i> , o cavalo moderno. Animal relativamente grande, com aparato mastigatório desenvolvido para a trituração de alimento mais abrasivo, apresentando apenas o dígito médio.	21
Figura 2 - Gráfico hierárquico começando com uma representação artística do corte sagital clássico (A), a região da banda coronária é então detalhada em um formato tridimensional (B). Movendo-se distalmente está um diagrama das papilas terminais na junção epidérmica da sola-parede e como elas formam a linha branca (C). Em maior ampliação, a circulação lamelar e sua relação com a superfície parietal da falange distal, o tecido conjuntivo sublamelar e as lamelas epidérmicas são ilustradas (D). A microcirculação lamelar é ilustrada a seguir em uma figura que mostra as anastomoses arteriovenosas entre artérias e veias axiais e os capilares lamelares dentro das lamelas dérmicas secundárias (E). Em maior ampliação ainda, as células basais epidérmicas das lamelas epidérmicas secundárias, a membrana basal lamelar e os filamentos de colágeno do aparelho suspensor da falange distal ligados à membrana basal são mostrados (F). Finalmente, a célula mais importante de todo o sistema do casco, a célula basal epidérmica, é ilustrada para mostrar a ultraestrutura de seus anexos à membrana basal e às células ao seu redor (G). Adaptado de Pollitt (2016).	22
Figura 3 - Microfotografia do plano transversal proximal mostrando feixes de fibras de colágeno com coloração azul cruzando a derme sublamelar entre as lamelas epidérmicas com coloração vermelha e a superfície parietal da falange distal com coloração de vermelho claro. Os feixes de colágeno da derme sublamelar são lineares, separados por vasos sanguíneos e se inserem na face parietal da falange distal. Os feixes de colágeno se ramificam e entram nas lamelas dérmicas primárias entre as lamelas epidérmicas de coloração vermelha. Localizadas no tecido conjuntivo frouxo entre os feixes de colágeno estão numerosas veias, artérias e nervos. Observe o número e tamanho grande das veias sublamelares. Eles se anastomosam livremente entre si formando um extenso plexo venoso sublamelar. (coloração = Masson's trichrome.) Adaptado de Pollitt (2016).	23
Figura 4 - Esquema demonstrando detalhes das células epiteliais basais da lamela (CEBL). A) imagem mostra as CEBLs com núcleos fusiformes, orientados de forma perpendicular à membrana basal (MB). B) demonstra o citoesqueleto formado por filamentos intermediários de queratina com hemidesmossomos unindo as CEBLs à MB. Os desmossomos são responsáveis por manter as células unidas e os filamentos de actina juntamente com as junções de aderência vão conferir uma estabilidade maior ao complexo.	24
Figura 5 - Esquema descrevendo a etapa de glicólise que ocorre no citoplasma para produção de ATP e Piruvato. O piruvato é o produto que ao ser produzido entra na mitocôndria com o auxílio do transportador de monocarboxilato (MCT) ou sofre ação da enzima lactato desidrogenase para formação do lactato.	27

Figura 6 - Esquema ilustrativo da etapa do ciclo do ácido cítrico. O piruvato produzido na glicólise se associa com a coenzima A, formando a acetil-coenzima A (Acetil-CoA). Em seguida uma serie de ácidos são produzidos com a liberação de dióxido de carbono (CO ₂) e hidrogênio (H ₂) para a liberação de um ATP. O ciclo segue para a formação do ácido oxalacético, o qual servirá para formação do ácido cítrico.	28
Figura 7 - Proporção de peso sobre os membros torácico e pélvico e o centro de massa indicado pela seta vermelha em equino normal.	30
Figura 8 – A: equino deslocando o centro de massa para trás, em posição antiálgica. B: equino com fase caudal reduzida, arqueamento da região lombo sacra, atrofia de músculos do pescoço e passada encurtada; C: animal em decúbito esternal, com baixo escore corporal e presença de escaras de decúbito (Pollitt, 2016).....	31
Figura 9 - A - imagem apresentando o rápido desenvolvimento da laminite grave, demonstrado pela palpação da banda coronária e evidenciado pelo afundamento das estruturas esqueléticas dentro do casco; B - imagem apresentando os sulcos na muralha (cabeça de seta preta) na muralha do casco de equinos com laminite (imagem Pollitt, 2016).....	33
Figura 10 - Sequência de imagens mostrando a progressão da laminite crônica formando protuberância convexa e perfurando a região de sola (setas pretas), pela rotação da falange distal.....	33
Figura 11 - Esquema ilustrando o equino com síndrome cólica onde ocorre a mudança de pH, pelo acúmulo de ácido láctico, na câmara fermentativa, levando a morte de microorganismos, em especial Gram-negativas, com lesão na mucosa do ceco e absorção de PAMPs e DAMPs, os quais vão ativar o sistema imune inato e degradar a membrana basal (Catunda, 2019).....	34
Figura 12 - Microfotografias de tecido laminar de cavalos com laminite induzida por extrato de noqueira preta (BWE), mostrando a imunolocalização de calprotectina (CP) (vermelho) nos seguintes grupos: controle (CON), ponto inicial (ETP, 1,5 horas após BWE), ponto de tempo de desenvolvimento (DTP, 3–4 horas após BWE) e ponto de tempo de claudicação (LAM, 10–12 horas, após BWE). Observe o número crescente de leucócitos perivasculares no tecido laminar em pontos de tempo anteriores (começando em ETP, setas pretas) e ao redor dos vasos da derme profunda em pontos de tempo posteriores (começando em DTP, setas amarelas). Observe também o intenso sinal de calprotectina epidérmica no grupo LAM (setas azuis) em comparação com a coloração insignificante na epiderme laminar no CON ou pontos de tempo BWE anteriores (setas azuis). Barras de escala 5 240 mm, hematoxilina como contraste (Faleiros et al., 2009).....	37
Figura 13 - Ilustração demonstrando as subunidades dos complexos mTOR 1 e 2. Note que no complexo mTOR 1 possui a proteína reguladora Raptor, enquanto no complexo 2 possui a proteína Rictor, que regula a estabilidade deste.	39
Figura 14 - Esquema demonstrando a via de sinalização intracelular PI3K/AKT/mTOR em resposta a ativação do sistema imune pela produção de interleucina-6 (IL-6). Note que uma vez ativado o complexo da Mammalian Target of Rapamycin 1 ocorre a produção e fosforilação da proteína ribossomal S6 (RPS6).....	41
Figura 15 - Microfotografia de lamelas epidérmicas de casco de equinos submetidos ao modelo de indução de laminite por oligofrutose. Coluna da esquerda imagens com objetiva de 10x. Coluna da direita imagens com objetiva de 40x. A e B demonstra lamelas epidérmicas normais, com núcleos das células epitélio basais lamelares (CEBLs) fusiforme e membrana basal íntegra. C e D – tempo 12h de indução de laminite por oligofrutose. Imagens demonstrando o alongamento das lamelas primárias e secundárias, grande parte dos núcleos das CEBLs em formato arredondados e início do desprendimento da membrana basal. E e F – tempo 36h de indução de laminite por oligofrutose. As imagens demonstram um alongamento exacerbado das lamelas primárias e secundárias, maioria dos núcleos arredondados. É possível observar muitas áreas de desprendimento da membrana basal. Cortesia Cota (2021).	43

Figura 16 - Microfotografia das lamelas do casco anterior esquerdo 7 dias após a indução da laminite. A) A inserção, na mesma ampliação, mostra as lamelas do cavalo de controle normal. As LEPs afetados pela laminite são mais longos que o normal. O eixo queratinizado dos LEPs é relativamente inalterado, mas em ambos os lados há colunas anormais de células epidérmicas parcialmente queratinizadas (setas). Linha A = comprimento lamelar epidérmico total. Linha B = comprimento lamelar epidérmico primário queratinizado. LDP = lamela dérmica primária. B) Porção axial lamelar após 7 dias de indução da laminite. A maioria das células epidérmicas que formaram ilhas isoladas ligadas a MB assemelham-se às células basais de LESs normais. Alguns têm núcleos picnóticos escuros (seta) e há células ocasionalmente vacuolizadas (cabeça de seta). Capilares estão presentes (pequenas setas) nas bases das ilhas CEB. Agregados redondos de células queratinizadas estão presentes em algumas das ilhas (asteriscos). Coloração = hematoxilina e eosina (Van Eps e POLLITT, 2009).....	44
Figura 17 - Molécula tridimensional do receptor de interleucina-6. Esquema ilustrativo do complexo citocina (IL-6) e receptor (IL-6R) associado a glicoproteína 130.	46
Figura 18 - Molécula tridimensional do receptor de interleucina-6. Esquema ilustrativo do complexo citocina (IL-6) e receptor (IL-6R) associado a glicoproteína 130.	46
Figura 19 - A esquerda a imagem demonstra a molécula de interleucina 6 (IL-6) em formato tridimensional apresentando 4 hélices (A, B, C e D). A direita a mesma molécula demonstrando suas porções lingantes. Note que a molécula possui 3 locais de ligação, sendo o local I para interagir com o receptor de interleucina 6 e os locais II e III para a glicoproteína 130 (gp130).	45
Figura 20 - Esquema da cascata de eventos de sinalização celular da via JAK/STAT3. Note que após a estimulação de receptores de IL-6 ocorre o recrutamento de moléculas glicoproteína-130, Janus Kinase e STAT3 do citoplasma para a membrana celular. Essas moléculas sofrerão fosforilação de tirosinas, ativando a STAT3, para que esta siga para o núcleo, ligando ao DNA e promovendo a transcrição dele.	48
Figura 21 - Microfotografia do processo de contagem de células em amostras lamelares. Três campos (1,67 mm ²) obtidos das camadas sublamelar e lamelares axial e abaxial.	57
Figura 22 - Microfotografia lamelar de casco de equino submetido a o modelo de indução de laminite por oligofrutose. As imagens A e B correspondem a região axial e abaxial da lamela epidermal no aumento de 40x e 80x, respectivamente, para o anticorpo p-RPS6 240/244. C e D representa a região axial e abaxial da lamela epidérmica com aumento de 40x e 80x, respectivamente, para o anticorpo Rictor. E e F representa a região axial e abaxial da lamela epidérmica com aumento de 40x e 80x, respectivamente, para o anticorpo Raptor. Note que as imagens foram posicionadas de modo a ficar 50% de derme e 50% epiderme. Lâminas processadas por imunistoquímica para Imunolocalização das proteínas p-RPS6 240/244, Rictor e Raptor.....	58
Figura 23 - Calibragem do software Imagem J para porcentagem de área total corada para a Rictor no aumento de 10x. As imagens capturadas foram enviadas para o programa Image J® e usado a função Threshold Color para calibrar o espectro de cor (Hue) a saturação e a intensidade da marcação (Brightness) do DAB referente ao Rictor.....	59
Figura 24 - Calibragem do software Imagem J para contagem de pixels com tamanho semelhante ao da célula para a p-RPS6. As imagens capturadas foram enviadas para o programa Image J® e usado a função Threshold Color para calibrar o espectro de cor (Hue) a saturação e a intensidade da marcação (Brightness) do DAB referente a p-RPS6 (ser235/236) e (ser240/244). Para análise das partículas o tamanho calibrado foi de 32 ao infinito.	59
Figura 25 - Calibragem do software Imagem J para porcentagem de área total corada em área de 25µm ² para Raptor e Rictor no aumento de 80x. Na imagem superior, a calibragem representada nas lâminas de Raptor com a esquerda mostrando a área corada na derme lamelar e direita epiderme. Na imagem inferior, a calibragem representada nas lâminas de Rictor com	

a esquerda mostrando a área corada na epiderme e direita, a imagem demonstra a derme lamelar.	60
Figura 26 - Microfotografia demonstrando células positivas pRPS6+ (Ser 240/244) na região apical do tecido lamelar de 18 equinos com laminite induzida por oligofrutose. A representa o tempo basal (CON, n=17). Note que quase não foi observado marcação de células positivas. Isso foi observado na imagem B representando 12 horas após a indução da laminite (ETP, n=11); C 36h após a indução (OG1, n=18), a derme se encontra bastante corada; e na imagem D 60-73 horas (OG3, n=7), além da derme, a epiderme também se encontra corada, após a administração de oligofrutose.....	61
Figura 27 - Distribuição percentual de células p-RPS6+ (Ser 240/244) na epiderme e derme das lamelas axial e abaxial do estrato lamelar do casco em equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose antes (CON) e após 12 horas (ETP) de indução, no início da claudicação (LAM) e com claudicação avançada (OG3).....	62
Figura 28 - Microfotografia exemplificando a contagem em 9 campos, sendo 3 na região de derme sublamelar, 3 na região axial e 3 na região abaxial das lamelas epidérmicas. Os campos foram selecionados de forma aleatória com no aumento de 10x.....	77
Figura 29 - Microfotografia lamelar de casco de equino submetido a o modelo de indução de laminite por oligofrutose. As imagens A e B correspondem a região axial e abaxial da lamela epidermal, no tempo 36h, no aumento de 40x e 80x, respectivamente, para o anticorpo p-STAT3. Note que as imagens foram posicionadas de modo a ficar 50% de derme e 50% epiderme. Lâminas processadas por imunistoquímica para imunolocalização da proteína p-STAT3.	77
Figura 30 - Calibragem do software Imagem J® para contagem de pixel de tamanho variando 3-6, corada para a p-STAT3 no aumento de 10x. As imagens capturadas foram enviadas para o programa Image J® e usado a função Threshold Color para calibrar o espectro de cor (Hue) a saturação e a intensidade da marcação (Brightness) do DAB referente ao p-STAT3. Em A representa a imagem antes da calibragem. B representa a imagem após a calibragem. Note a marcação do software em vermelho sobre a marcação marrom do DAB.	78
Figura 31 - Contagem de células positivas para p-STAT3 nos diferentes tempos estudados e nas regiões de derme (A), epiderme axial (B) e epiderme abaxial (C), no aumento de 10x.	80
Figura 32 - Microfotografia demonstrando células positivas p-STAT3 na região apical do tecido lamelar de 18 equinos com laminite relacionada a sepse (marcação em marrom por DAB e hematoxilina na contracoloração). A representa o grupo CON. Note que não foi observada marcação de células positivas. Isso foi observado na imagem B representando 12 horas após a indução da laminite; C 36h após a indução (LAM), tanto a derme quanto a epiderme se encontram com marcações nos núcleos das células; e na imagem D 60-73 horas (OG3), as marcações continuam no tecido de derme lamelar e no núcleo das células epidérmicas, após a administração de oligofrutose.....	80
Figura 33 - Microfotografia do ápice da lamela epidermal primária, no tempo 36h, demonstrando núcleo dos queratinócitos alongados (seta verde) corados por DAB, para p-STAT3. Note também o núcleo de alguns de fibroblastos marcados de marrom na região de derme lamelar (seta vermelha).	81
Figura 34 - Calibragem para contagem de células positivas para calprotectina.....	89
Figura 35 - Médias e erros-padrão das contagens de células positivas para calprotectina em equinos submetidos ao modelo de laminite, nos momentos antes (CONTROL) e 12h (ETP) e 36 horas (LAM) depois da administração gástrica de oligofrutose e quando a claudicação evoluiu para grau 3 de Obel (60 a 72 horas).....	90
Figura 36 - Índices de correlação (Pearson) entre contagens de células positivas para calprotectina e proteínas de sinalização intracelular p-STAT3, p-RPS6, Rictor e Raptor no	

tecido lamelar de equinos submetidos a laminite relacionada à sepse. Coluna da direita demonstra o valor de r em escala de cor para a correlação fraca, leve, moderada e forte.....91

Figura 37 - Diagrama de cores correspondentes a valores de P obtidos pela correlação (Pearson) entre contagens de células positivas para calprotectina e proteínas de sinalização intracelular p-STAT3, p-RPS6, RICTOR e RAPTOR no tecido lamelar de equinos submetidos a laminite relacionada à sepse. Coluna da direita demonstra nível de significância de acordo com a em escala de cores.91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA – Acetil coenzima A
ADP – Adenosina difosfato
AKT – Proteína quinase B
AMP – Adenosina Monofostadada
ATP – Adenosina Trifosfato
ATPase – Adenosina trifosfatase
AVA – Anastomose Arteriovenosa
BWE – Extrato de Nogueira Preta
C – Carbono
CD14 – Cluster de diferenciação 14
CEBL – Célula Epitélio Basal Lamelar
CEB – Célula Epitélio Basal
CoA – Coenzima A
CON – Controle
COX - Cicloxigenase
DAB - Diaminobezidina
DAMP – Padrões Moleculares Associado ao Dano
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ETP – Early Time Point
FADH2 – Dinucleotídeo Flavina Adenina
GLUT – Transportadores de Glicose
GLUT1 – Transportador de Glicose 1
GP130 – Glicoproteína 130
GβL – Proteína 8 SEC13 letal para mamíferos
HK – Hexoquinase
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
H₂O_d – água deionizada
ICAM1 – Molécula de Adesão Intercelular 1
IL-1β – Interleucina-1β
IL-6 – Interleucina-6
IL-6R – Receptor de IL-6
IL-8 – Interleucina-8
JAK – Janus Kinase
K⁺ - íon potássio
LDP – Lamela Dermal Primária
LDS – Lamela Dermal Secundária
LEP – Lamela Epidermal Primária
LES – Lamela Epidermal Secundária
LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK – Proteína Quinase Ativado por Fosfato de Adenosina
MB – Membrana basal
MCT – Transportador de monocarboxilato

mLST8 – Proteína 8 SEC13 letal para mamíferos
MOs – Microorganismos
MODS – Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos
MOFS – Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos
mTOR – Mammalian Target of Rapamicyn
mTORC1 – Mammalian Target of Rapamicyn Complex 1
mTORC2 – Mammalian Target of Rapamicyn Complex 1
MAPK - Mitogen Activated Protein Kinases
MB – Membrana Basal
Na⁺ - íon sódio
NADH – Dinucleotídeo Nicotinamida Adenina
NADPH – Fosfato de hidrogênio Dinucleotídeo Nicotinamida Adenina
NFκB – Fator nuclear κ B
OG1 – Grau de Obel 1
OG3 – Grau de Obel 3
PAMP – Padrões Moleculares Associados ao patógeno
PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato
PIAS – Inibidor da ativação da proteína STAT
PI3K – Fosfatidilinositol 3-Quinase
PTP nuclear – proteínas de fosforilação de tirosina nuclear
RAPTOR – Proteína Associada à Regulação da mTOR no Complexo 1
RICTOR – Proteína Associada à Regulação da mTOR no Complexo 2
RNA – Ácido Ribonucleico
RPS6 – Proteína Ribossomal S6
RTK – Receptor de Tirosina Quinase
SGK1 – Quinase 1 ativada por glicocorticóides
SGLT – Transportadores Ligados a Glicose-Sódio
SH2 – Domínio Homólogo de Fosfotirosina Src
SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SOCS – Supressor de sinalização de tirosina
STAT - Fator de Transcrição e Ativação de Sinal de Transdução
STAT1-4 - Fator de Transcrição e Ativação de Sinal de Transdução 1-4
STAT3 - Fator de Transcrição e Ativação de Sinal de Transdução 3
STAT5α - Fator de Transcrição e Ativação de Sinal de Transdução 5α
STAT5β - Fator de Transcrição e Ativação de Sinal de Transdução 5β
STAT6 - Fator de Transcrição e Ativação de Sinal de Transdução 6
T0 – Tempo 0 → antes da indução com oligofrutose
T12 – Tempo 12 h após a indução com oligofrutose
T36 – Tempo 36 h após a indução com oligofrutose
T60-72 – Entre os tempos 60 a 72 horas após a indução com oligofrutose
TBST – Solução Salina Tamponada com Tris e polissorbato 20
TLR4 – Receptor Toll like 4
TNFα - Fator de necrose tumoral α

TOR – Target of Rapamicyn

TSC – Complexo de Tuberosidade Esclerótica

TSC1 – Complexo de Tuberosidade Esclerótica 1

TSC2 – Complexo de Tuberosidade Esclerótica 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1. HIPÓTESE	18
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivos geral	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
2. ANATOMIA E ARQUITETURA LAMELAR.....	20
3. METABOLISMO LAMELAR.....	25
4. CAUSAS E FASES DA LAMINITE.....	29
4.1. Período prodrômico, fase aguda e crônica da laminite.....	31
5. PATOFISIOLOGIA DA LAMINITE DE ORIGEM INFLAMATÓRIA	34
6. VIA DE SINALIZAÇÃO Akt/mTOR/RPS6 NO METABOLISMO CELULAR	37
6.1. Proteína ribossomal S6	40
6.2. Evidência da ativação da via AKT/mTOR/RPS6 no tecido lamelar de equinos.....	42
7. INTERLEUCINA 6 (IL-6)	44
8. VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3.....	46
8.1 Evidência da ativação da via jak/stat3 no tecido lamelar de equinos	49
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
CAPÍTULO 2: FOSFORILAÇÃO DE RPS6 VIA COMPLEXOS mTORC1 e mTORC2 NO TECIDO LAMELAR DE EQUINOS SUBMETIDOS A LAMINITE POR OLIGOFRUTOSE	51
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1. Aquisição das amostras	54
2.2. Imunohistoquímica	54
2.3. Análise das imagens	56
2.4. Análise estatística.....	60
3. RESULTADOS.....	61
4. DISCUSSÃO.....	67
5. CONCLUSÃO	71
CAPÍTULO 3: EXPRESSÃO ESTRATIFICADA DE STAT3 FOSFORILADA NO TECIDO LAMELAR DO CASCO DE EQUINOS COM LAMINITE INDUZIDA POR OLIGOFRUTOSE.....	72
1. INTRODUÇÃO	74

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1. <i>Aquisição das amostras</i>	<i>75</i>
2.2. <i>Imunohistoquímica.....</i>	<i>75</i>
2.3. <i>Análise das imagens</i>	<i>76</i>
2.4. <i>Análise estatística.....</i>	<i>79</i>
3. RESULTADOS	79
4. DISCUSSÃO.....	81
5. CONCLUSÃO	84
CAPÍTULO 4 - CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO LAMELAR DE CALPROTECTINA E DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS COM PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM EQUINOS COM LAMINITE.....	85
1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	87
2.1. <i>Aquisição das amostras</i>	<i>87</i>
2.2. <i>Análise das imagens</i>	<i>89</i>
2.3. <i>Análise estatística.....</i>	<i>89</i>
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
4. CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	96

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que, anualmente, a laminite nos Estados Unidos da América gera prejuízos na casa de milhões de dólares, onde 75% dos animais acometidos ficam com graves sequelas que os impossibilitam de atividades físicas e reprodutivas. Estudos e revisões mostram a ocorrência de laminite variando entre 2% e 4% em doenças intestinais, anualmente (MUNOZ et al., 2008; REBIERE, 2009) e cerca 11% em casos de diarreia aguda (COHEN; WOODS, 1999). Nesse caso, o cavalo assume um risco vitalício de desenvolver laminite estimado em aproximadamente 15%, tornando a doença prioridade máxima em pesquisas pelos membros da Associação Americana de Praticantes de Equinos (AAEP) (COLEMAN; COHEN, 2012).

Sob uma ótica geral, a laminite se apresenta como uma doença extremamente dolorosa, em que ocorre a perda de conexão da muralha do casco com a falange distal. Além da situação deplorável, a laminite traz consigo o caráter emocional para proprietários, treinadores e médicos veterinários pela perda da função atlética ou mesmo a vida do paciente acometido (BELKNAP, 2017).

Provavelmente, Xenophon (380 a.C) foi o primeiro a escrever sobre a laminite que na época ocorria pela ingestão de excesso de cevada e, já nesse tempo, o autor citava que a doença seria mais fácil de tratar no início do seu curso. Aristóteles, (330 a.C) mencionou a laminite em cavalos que eram criados de forma extensiva oriunda de pastagem. No seu relato ele já mencionava a perda dos cascos dos animais acometidos (SPADETO, 2017).

Tal doença é conhecida a longas datas com o viés de afecção desafiadora e, embora a laminite de origem inflamatória não seja a modalidade mais comum, sem sombra de dúvida é a mais complexa quando o assunto é tratamento, visto que o período prodrômico para a manifestação dos sinais clínicos é extremamente abreviado, quando comparado à laminite de origem endocrinopática (WAGNER; HEYMERING, 1999).

Visando o melhor entendimento desta afecção, a sociedade científica elaborou modelos de indução de laminite. Esses proporcionaram o conhecimento de que a laminite ocorre quase que exclusivamente como uma afecção secundária a processos inflamatórios intensos como cólicas, pleuropneumonias e metrites (GARNER et al.,1975; VAN EPS; POLLITT, 2006; MINNICK et al., 1986).

Estudos recentes têm demonstrado que as células epiteliais basais do tecido lamelar (CEBLs) são unidade robustas capaz de realizar sua função plenamente em um cavalo saudável. Mas que em casos de laminite, podem ser o elo mais frágil na hierarquia dos tecidos que constituem o

aparato suspensor da falange distal (ASFD). Uma estrutura complexa intacta que neutraliza grandes forças físicas, mas que falhará ao se deparar com alterações patológicas como a citada anteriormente (POLLITT, 2017).

Tais alterações estão relacionadas a transição mesenquimal com alteração fenotípica celular, onde a sinalização da PI3K/mTOR/RPS6 e da JAK/STAT3 podem estar inseridas nesse contexto. Tais vias são bem preservadas nas diferentes espécies e em várias doenças, como câncer, psoríase e diabetes.

1. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que o desenvolvimento e a intensidade de lesões lamelares em cavalos com laminite relacionada à sepsé são associados e positivamente correlacionados com a expressão de proteínas efetoras relacionadas à sinalização de mTOR e STAT3.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos geral

Avaliar a expressão e a imunolocalização das proteínas intracelulares RPS6, STAT3, Calprotectina, Rictor e Raptor, por meio de imunohistoquímica, de amostras de casco de equinos, submetidos ao modelo de laminite de origem séptica por oligofrutose.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar e comparar a expressão das proteínas fosforiladas da sinalização mTOR (Rictor, Raptor, RPS6 (ser 235/236; ser 240/244) em tecido lamelar de equinos expostos ao modelo SRL (oligofrutose).
- Determinar a expressão da proteína fosforilada STAT3 em tecido lamelar de equinos expostos ao modelo SRL (oligofrutose).
- Correlacionar a expressão da proteína fosforilada STAT3 e RPS6 (ser 235/236; ser 240/244) em tecido lamelar de equinos expostos ao modelo SRL (oligofrutose).
- Correlacionar a expressão da proteína fosforilada STAT3 e calprotectina em tecido lamelar de equinos expostos ao modelo SRL (oligofrutose).
- Correlacionar a expressão da proteína fosforilada RPS6 (ser 235/236; ser 240/244) e calprotectina em tecido lamelar de equinos expostos ao modelo SRL (oligofrutose).

CAPÍTULO 1: LAMINITE DE ORIGEM INFLAMATÓRIA – UMA VISÃO HOLÍSTICA - REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A lamela digital dos equinos apresenta uma similaridade anatômica com os componentes da pele dos mamíferos, constituindo de derme e epiderme interposta por uma membrana basal. No entanto, sua função extrapola a proteção, pois ela é capaz de suportar todo o peso do equino, suspendendo a terceira falange dentro do casco. Além disso, a matrix de colágeno garante a suspensão, lançado seus feixes de fibras da porção parietal da terceira falange em direção a membrana basal (LEISE, 2018).

A laminite é uma doença dolorosa e debilitante que afeta os cascos dos equinos, causando inflamação na lâmina, uma estrutura interna do casco responsável pela conexão entre a porção parietal da terceira falange e a parte interna da muralha do casco (POLLITT, 2010). É uma condição que pode ter graves consequências para a saúde e o bem-estar dos cavalos, resultando em claudicação e até mesmo em casos mais graves, na eutanásia do animal (BELKNAP, 2017). A laminite pode ser desencadeada por uma série de fatores, sendo as principais causas associadas à alimentação inadequada, sobrepeso, ingestão excessiva de grãos, ingestão de gramíneas ricas em carboidratos fermentáveis, sobrecarga de trabalho, trauma ou lesões no casco, bem como desequilíbrios hormonais, como a síndrome metabólica equina (SUAGEE et al., 2012; FALEIROS, et al., 2009). Além disso, a laminite também pode ser secundária a outras condições, como a síndrome do Cushing, que afeta a regulação hormonal no organismo do cavalo.

Os sinais clínicos da laminite podem variar desde uma leve claudicação até uma incapacidade severa de locomoção. Os equinos afetados geralmente apresentam rigidez, relutância em se mover, postura anormal ou deitada, pulso digital aumentado (sentido na artéria digital), calor nos cascos e, em casos graves, rotação ou afundamento da terceira falange. O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos apresentados, exame físico, radiografias dos cascos e, em alguns casos, testes laboratoriais para avaliar possíveis desequilíbrios metabólicos.

O fato da laminite em equinos ser uma doença complexa para a qual existem múltiplas condições ou eventos predisponentes, contribuintes ou incitantes, os esforços terapêuticos e preventivos são limitados. A compreensão incompleta da cascata de eventos bioquímicos e celulares no desenvolvimento da doença é o maior limitador no desenvolvimento de estratégias terapêuticas (BUDAK, et al., 2009).

Nesta revisão, exploraremos os principais aspectos da laminite em equinos, incluindo a anatomia lamelar, metabolismo lamelar, suas causas, sintomas, fisiopatologia com a sinalização intracelular para transição mesenquimal lamelar. Essa revisão busca fomentar embasamento teórico para o melhor entendimento dos capítulos seguintes.

2. ANATOMIA E ARQUITETURA LAMELAR

O cavalo contemporâneo, ou por assim dizer, o cavalo moderno, é um exemplo impressionante da bioengenharia evolutiva. O primitivo equino que viveu no período eoceno, *Hyracotherium*, possuía um aparato mastigatório com dentes de coroa pequena, adaptado a maceração de folhas macias e altamente nutritivas. Outra característica importante desse animal era possuir quatro dígitos em cada membro (FROEHLICH, 2002).

Passaram-se 52 milhões de anos, com intermediários evolutivos que, aos poucos, viria a se tornar o cavalo moderno (Fig. 1). Um animal que, à medida que minguava os dígitos, desenvolvia um aparato mastigatório com dentes apresentando uma grande coroa de reserva, capaz de suportar longos períodos triturando um alimento menos nutritivo e mais abrasivo (FROEHLICH, 2002).

A locomoção tornou os equídeos modernos animais unglígrados, apresentando um único casco que compreende a falange distal referente ao terceiro metacarpo/metatarso em cada membro (POLLITT, 2016). Essa evolução, apesar de tratar de animais grandes, pesando aproximadamente 450 Kg, proporcionou maior velocidade e agilidade, com membros relativamente leves para conferir versatilidade (POLLITT, 2016).

Segundo Leach (1980), a parede do casco cresce ao longo da vida do equino para substituir o tecido perdido pelo desgaste com a superfície do solo. A regeneração é contínua na região coronária, onde há células germinativas (células epiteliais basais) que produzem populações de células jovens (queratinócitos ou células produtoras de queratina), as quais irão amadurecer e queratinizar constantemente. Apesar de ser ausente de pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas, esse tecido é derivado da pele, sendo modificado para desempenhar função específica (FALEIROS; BELKNAP, 2017).

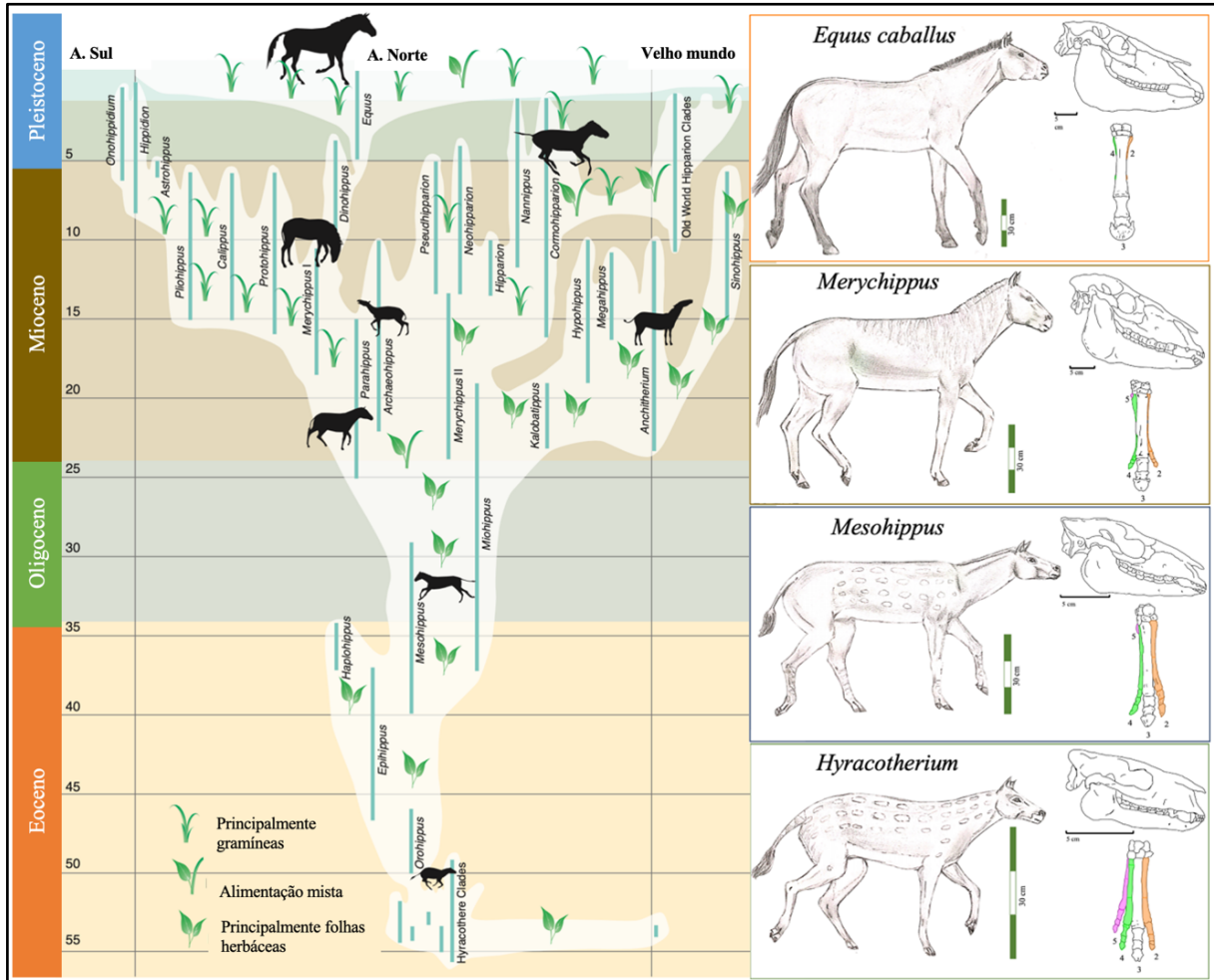


Figura 1 - Esquema evolutivo de 55 milhões de anos do cavalo. O período Eoceno demonstra o ancestral primitivo (*Hyracotherium*). Um animal pequeno, aproximadamente do tamanho de um cão de pequeno porte, contendo dentes de coroa curta, adaptados a maceração de folhas macias e altamente nutritivas. Note também que esse animal apresentava 4 dígitos. No período Oligoceno surge o *Meshippus*. Um animal um pouco maior com apoio ao solo em três dígitos. Posteriormente, aparece o *Merychippus*, com três dígitos, porém apoiado apenas no dedo médio. No período Pleistoceno surge o *Equus caballus*, o cavalo moderno. Animal relativamente grande, com aparato mastigatório desenvolvido para a trituração de alimento mais abrasivo, apresentando apenas o dígito médio (arquivo pessoal).

No entanto, o tecido córneo queratinizado presente no casco, topograficamente é dividido em porção dorsal (pinça), região lateral ou medial (quartos) e região palmar/plantar para os talões. O estojo córneo consiste em três camadas, sendo elas estrato externo, médio interno. O estrato externo é representado por uma delgada camada denominada perióplio (Fig. 2). O estrato médio é composto por túbulos e intertúbulos, que representam a camada mais espessa. É o principal sistema de suporte de carga, atuando de forma a transferir a força de reação do solo para o esqueleto apendicular. Mais interno temos o extrato interno o qual é formado pelas células epidermais, configurando as lamelas epidermais primárias e secundárias, com um eixo queratinizado (POLLITT, 2004; POLLITT, 2010).

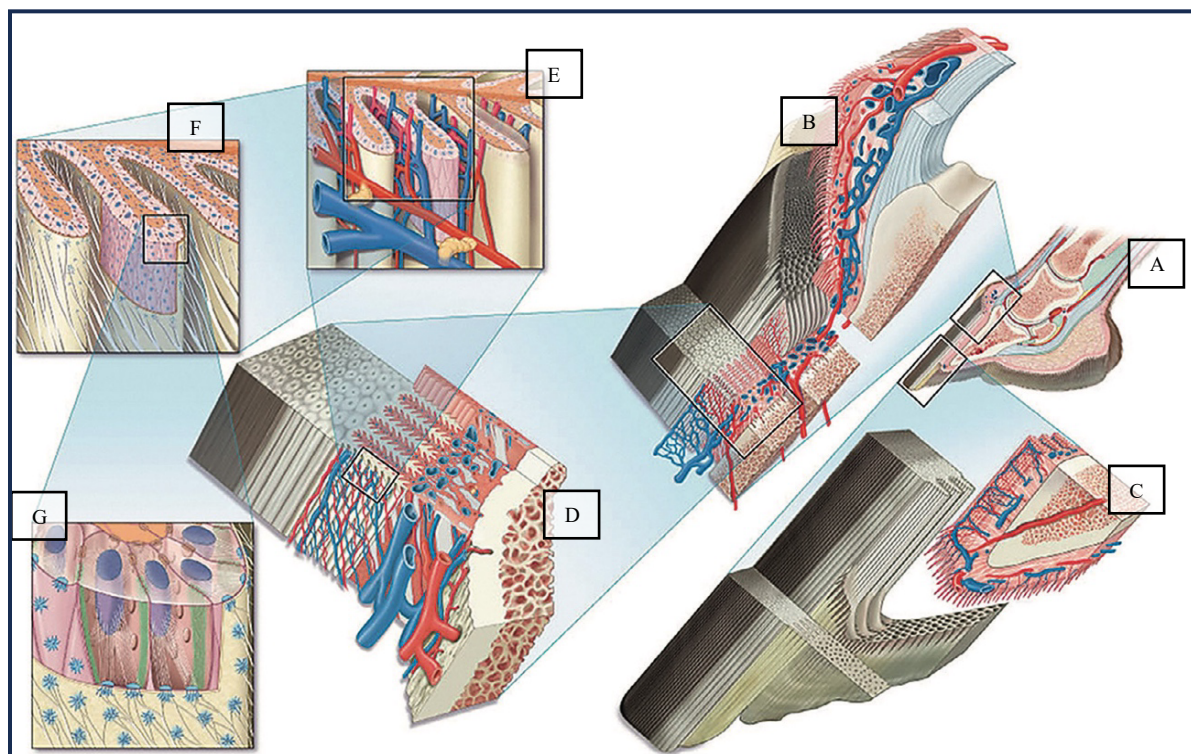


Figura 2 - Gráfico hierárquico começando com uma representação artística do corte sagital clássico (A), a região da banda coronária é então detalhada em um formato tridimensional (B). Movendo-se distalmente está um diagrama das papilas terminais na junção epidérmica da sola-parede e como elas formam a linha branca (C). Em maior ampliação, a circulação lamelar e sua relação com a superfície parietal da falange distal, o tecido conjuntivo sublamelar e as lamelas epidérmicas são ilustradas (D). A microcirculação lamelar é ilustrada a seguir em uma figura que mostra as anastomoses arteriovenosas entre artérias e veias axiais e os capilares lamelares dentro das lamelas dérmicas secundárias (E). Em maior ampliação ainda, as células basais epidérmicas das lamelas epidérmicas secundárias, a membrana basal lamelar e os filamentos de colágeno do aparelho suspensor da falange distal ligados à membrana basal são mostrados (F). Finalmente, a célula mais importante de todo o sistema do casco, a célula basal epidérmica, é ilustrada para mostrar a ultraestrutura de seus anexos à membrana basal e às células ao seu redor (G). Adaptado de Pollitt (2016).

A parede tubular do casco composta de queratina dura, é rica em ligações dissulfeto e tem grande resistência física. Por outro lado, o perióplo, a ranilha e a zona branca são ricos em grupos sulfidril, mas pobres em ligações dissulfeto e têm menor resistência física com maior elasticidade (POLLITT, 2004).

A resistente cápsula do casco protege estruturas mais sensíveis e macias dentro do estojo córneo, permitindo que o cavalo possa galopar sobre uma variedade de terrenos, desde secos e rochosos, até solos úmidos e frouxos. Tais estruturas internas compreendem a parte sensível e vascularizada do dígito além da falange distal e parte da falange média (POLLITT, 2004).

A falange distal é suspensa da parede interna do casco por um aparato de fixação lamelar muito especializado e resiliente, que muda diariamente em resposta ao fluxo contínuo de fatores externos e interno e, não apenas suporta o peso do cavalo, mas desempenha um papel vital na melhora do impacto do membro ao solo e das forças rotacionais inerentes a ele (FRENCH; POLLITT, 2004). Assim, o esqueleto apendicular possui estruturas funcionais capazes de

realizar um único e essencial papel que é promover a sustentação da falange distal. Essa sustentação depende da capacidade das junções lamelares, ou junções dermo-epidérmicas, em manter sua morfologia na presença de um grande estresse físico (LANE et al., 2017).

A origem do aparato suspensor da falange distal é uma rede reticular densa de feixes de colágeno robustos, denominado estrato reticular, que se encontra firmemente inserida no córtex parietal da falange distal. Os feixes de colágeno cruzam a derme sublamelar (Fig. 3) em ângulos alinhados com a tensão e, finalmente, inserem-se c finos filamentos na membrana basal lamelar (POLLITT, 2017).

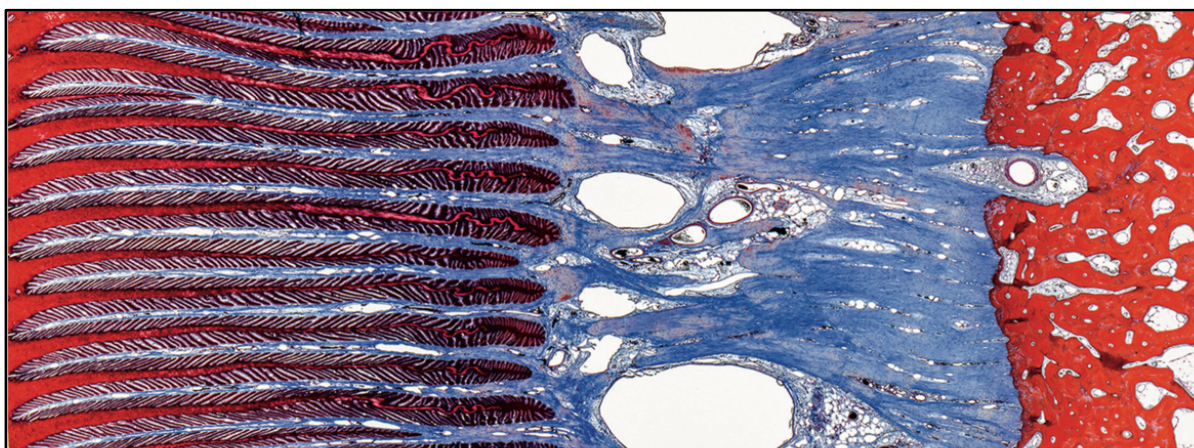


Figura 3 - Microfotografia do plano transversal proximal mostrando feixes de fibras de colágeno com coloração azul cruzando a derme sublamelar entre as lamelas epidérmicas com coloração vermelha e a superfície parietal da falange distal com coloração de vermelho claro. Os feixes de colágeno da derme sublamelar são lineares, separados por vasos sanguíneos e se inserem na face parietal da falange distal. Os feixes de colágeno se ramificam e entram nas lamelas dérmicas primárias entre as lamelas epidérmicas de coloração vermelha. Localizadas no tecido conjuntivo frouxo entre os feixes de colágeno estão numerosas veias, artérias e nervos. Observe o número e tamanho grande das veias sublamelares. Eles se anastomosam livremente entre si formando um extenso plexo venoso sublamelar. (coloração = Masson's trichrome.) Adaptado de Pollitt (2016).

A matriz densa do tecido conjuntivo do cório conecta a membrana basal da junção dermo-epidérmica à superfície periosteal da falange distal e, assim, suspende a falange distal da parede interna da cápsula do casco. As lamelas que se projetam internamente à parede do casco são chamadas de epidermais, formadas pelo eixo queratinizado e células epiteliais, sendo que as basais são ligadas fortemente à membrana basal. Do outro lado da membrana, tem-se a região dermal, formada por tecido conjuntivo denso e colagenoso, oriundo do periósteo modificado da falange distal que se insere do lado axial da membrana basal (Fig. 3) (POLLITT, 1992).

Projetando-se da parede interna do casco, temos os folhetos epidérmicos orientados proximodistal, em direção a derme. Cada lamela epidermal é formada por uma infinidade de células epiteliais lamelares (Fig. 4). Estas se encontram conectadas através de anexos suspensórios compostos por proteínas, que impedem a rotação e/ou afundamento da falange distal (POLLITT, 2016).

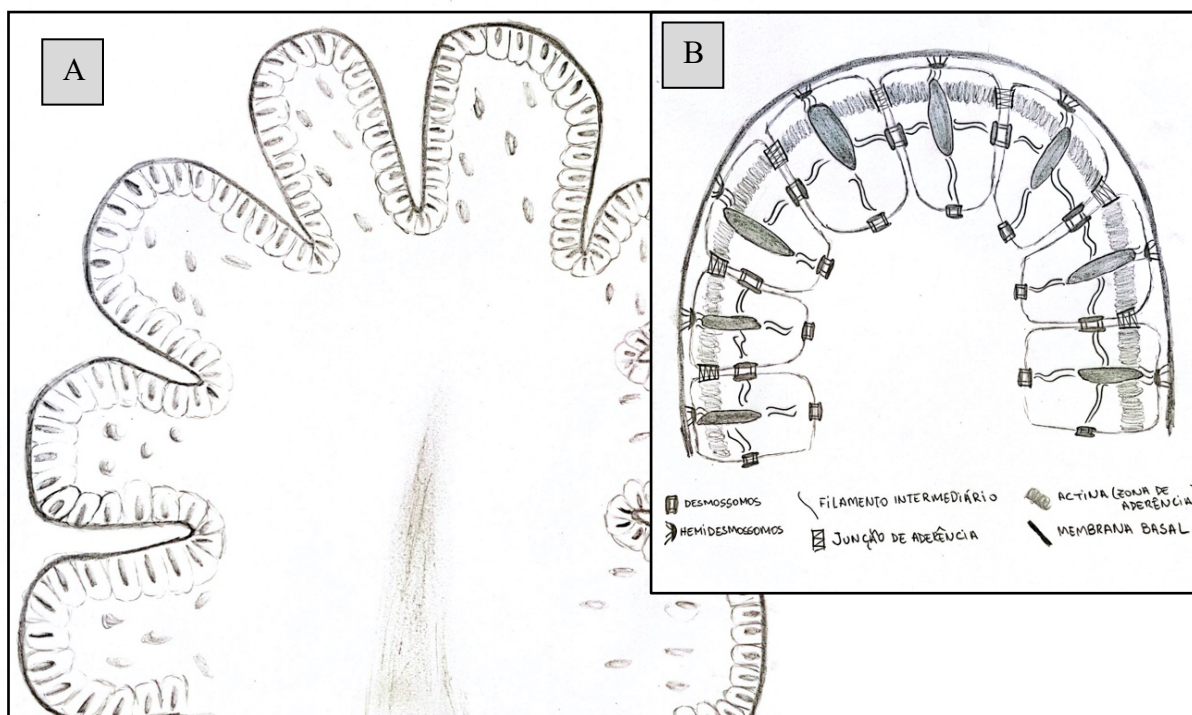


Figura 4 - Esquema demonstrando detalhes das células epiteliais basais da lamela (CEBL). A) imagem mostra as CEBLs com núcleos fusiformes, orientados de forma perpendicular à membrana basal (MB). B) demonstra o citoesqueleto formado por filamentos intermediários de queratina com hemidesmosomos unindo as CEBLs à MB. Os desmosomos são responsáveis por manter as células unidas e os filamentos de actina juntamente com as junções de aderência vão conferir uma estabilidade maior ao complexo (arquivo pessoal).

As artérias digitais palmares lateral e medial são oriundas da artéria digital comum. Elas surgem entre o ligamento suspensor e o tendão flexor digital profundo, e entram no dígito até formar o arco terminal. A partir daí, numerosos vasos atravessam a superfície parietal da falange distal que irão promover nutrição ao tecido lamelar (PARKS, 2017).

O cório, ou derme do casco, é um tecido altamente vascularizado e situa-se subjacente à parede do casco e consiste em uma matriz densa de tecido conjuntivo resistente contendo uma rede de artérias, veias e capilares, e nervos sensoriais e vasomotores (Fig. 3). Todas as partes do cório, exceto o cório lamelar, possuem papilas que se encaixam firmemente nos orifícios do casco adjacente. O cório lamelar possui lamelas dérmicas que se interdigitam com as lamelas epidérmicas da parede interna do casco. O sistema vascular do cório fornece nutrição ao casco (POLLITT, 2004).

Essa rede é formada por cerca de 500 anastomoses arteriovenosas (AVA)/cm² conectando as artérias axiais com as veias da lamela dermal. Embora mais numerosos nas bases dos vasos axiais, as AVAs estão presente em toda a extensão da lamela dermal, com uma rica presença de nervos vasomotores. Todo esse complexo possui um endotélio vascular elaborado para promover a termorregulação e a modulação da pressão, trazendo sangue arterial quente, quando

dilatadas, podendo causar rápida flutuação de temperatura na parede do casco (POLLITT, 2004).

O suprimento dorsoproximal do casco é oriundo da artéria coronária e artéria dorsal da falange média. Dorsodistalmente, a artéria dorsal da falange distal e o arco terminal darão origem à uma rede complexa de microvasculatura que irá irrigar essa região. O suprimento sanguíneo no aspecto palmar é oriundo dos ramos dos talões e da artéria palmar da falange distal (PARKS, 2017).

3. METABOLISMO LAMELAR

Segundo Wattle e Pollitt (2004), uma avaliação do consumo comparativo de glicose entre os cascos e o cérebro mostrou que, apesar de representarem cerca de 1% do peso corpóreo do equino, os cascos podem consumir até 15% de glicose arterial, enquanto o cérebro consome apenas 8% do que lhe é entregue. Outro ponto relevante é que os cascos apresentam baixa capacidade de armazenamento de glicogênio, quando comparado com a musculatura estriada.

Acredita-se que chegada de grande quantidade de glicose é essencial para as junções lamelares do casco se mantenham integras (PASS et al., 1998). Supostamente, as CEBLs absorvem glicose continuamente do fluido extracelular adjacente, sendo essa fornecida através de vasos sanguíneos na derme lamelar (FRENCH; POLLITT, 2004).

A glicose não é capaz de se difundir de forma simples pela camada bilipídica da membrana celular, fazendo com que a captação desta seja considerada etapa limitante da taxa de metabolismo e crescimento celular. Assim, essa molécula transpassa essa barreira através de proteínas de membrana especializadas como os transportadores ligados a glicose-sódio (SGLT) ou transportadores de glicose (GLUT) (BLIKSLAGER, 2017). Dessa forma, as lamelas se assemelham ao tecido cerebral que depende apenas do transportador de glicose 1 (GLUT1), para a captação de glicose de forma independente da insulina (FRENCH; POLLITT, 2004).

Os transportadores SGLT transportam a glicose contra um gradiente de concentração. Sendo assim, faz-se necessário o mecanismo de troca de íons através do sistema de transporte secundário, Na^+/K^+ ATPase, mantendo o gradiente de Na^+ . Os portadores de SGLT estão energeticamente acoplados ao cotransporte de sódio para manter o seu gradiente de concentração. Isso estabelece a principal diferença com os transportadores GLUT, que facilitam o movimento da glicose a favor do gradiente de concentração sem exigir a hidrólise primária ou secundária da adenosina trifosfato (ATP) (ZAMBRANO et al., 2019).

Ao passo que os transportadores de SGLT são essenciais para a absorção de glicose no intestino delgado, os GLUTs vão diferir em relação a seletividade do substrato, expressão tecidual e localização subcelular. Nesse contexto, o GLUT1 é encontrado na maioria dos tipos celulares, o qual, apresenta seletividade para o transporte de glicose, realizando o mecanismo de transporte alternativo do substrato e regulando diretamente a homeostase do açúcar (MUECKLER; THORENS, 2013). Sabe-se também que, a superexpressão da GLUT1 é especificamente afetada pela via PI3K/AKT e que a alteração da estabilidade da transcrição de GLUT1 está associada à variação das concentrações de glicose e à presença de fatores de crescimento, citocinas e alguns hormônios (WEI et al., 2017).

Como os carboidratos, em especial, a glicose, são a principal fonte de energia para células eucariontes, a absorção dessa molécula é muito importante no processo de regulação para a sinalização de fatores de crescimento. Fisiologicamente o metabolismo da glicose gera vários intermediários e equivalentes reduzidos, como adenina nicotinamida dinucleotídeo (NADH), flavina adenina dinucleotídeo (FADH) e o fosfato de adenina nicotinamida dinucleotídeo (NADPH), os quais são necessários para reações anabólicas (ZAMBRANO et al., 2019).

Assim, a glicose se qualifica para o potencial de produção de ATP por meio de etapas da glicólise, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Como as células epiteliais basais e parabasais lamelares não recebem aporte sanguíneo direto (Fig. 3), a alta demanda de glicose é necessária para o tecido epidermal, pois tais células vivem em um meio de relativa hipóxia e apresentam pequena quantidade de cristas mitocondriais. Isso as tornam pouco eficientes para produção de ATPs por fosforilação oxidativa (POLLITT, 2017). Assim, o alto consumo de glicose e o ambiente anaeróbico implica na produção de lactato, via piruvato, para o ciclo do ácido cítrico, culminando com a produção de ATP. Em células cancerosas, a reprogramação metabólica com a conversão de glicose em lactato é uma característica central, mesmo na presença de oxigênio. Trata-se de uma adaptação bioquímica denominada “efeito Warburg” (MASUI et al., 2014).

A glicólise é o processo, que ocorre no citoplasma, pelo qual alguns tipos celulares se beneficiam da produção de energia de maneira simples e primitiva. A metabolização da complexa molécula de glicose, ocorre através da enzima hexoquinase (HK), transformando em fosfato de glicose, através da adição de uma molécula de fosfato. Essa molécula sofrerá ação da enzima fosfoglicose isomerase para a formação do fosfato de frutose. Assim como a glicose, a frutose também apresenta 6 carbonos (6C) em sua molécula. No entanto, ela é uma molécula mais simétrica, o que favorece a ação de outra enzima, fosfofrutoquinase, fornecendo outro

fosfato, para transformá-la em difosfato de frutose. Esta molécula é quebrada simetricamente de modo a fornecer duas moléculas de fosfato de gliceraldeído. Para que essa primeira etapa da glicólise aconteça, duas moléculas de ATP são exigidas, para o fornecimento dos fosfatos (Fig. 5) (TURNER; TURNER, 1980).

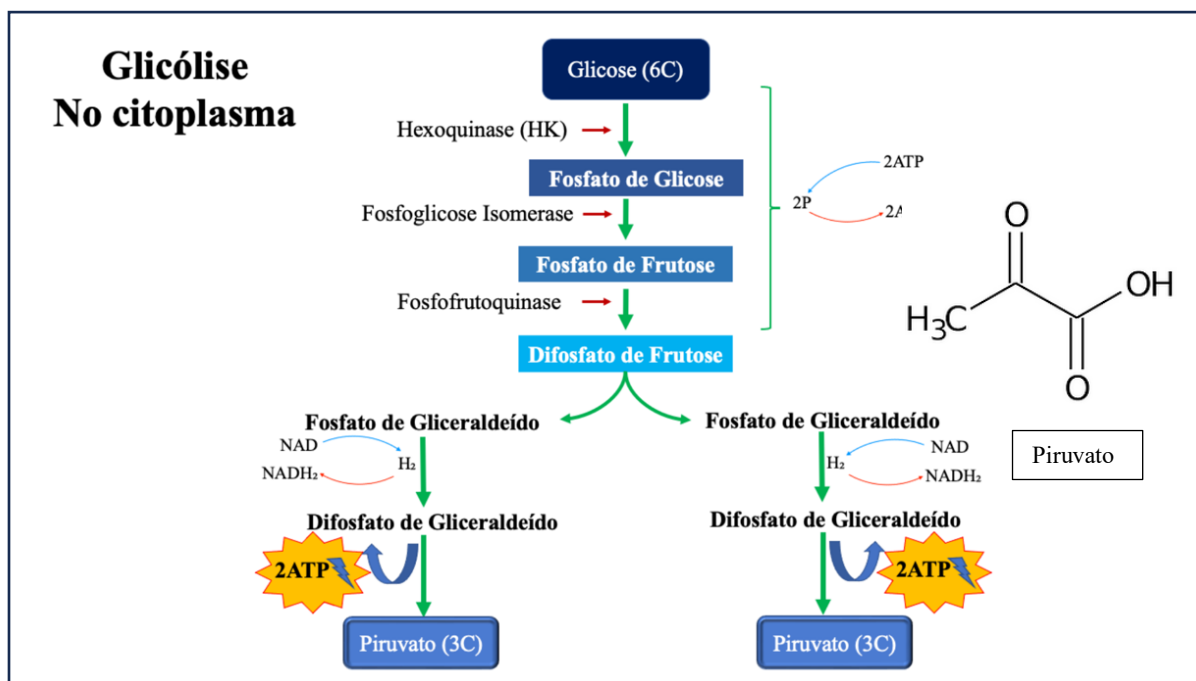


Figura 5 - Esquema descrevendo a etapa de glicólise que ocorre no citoplasma para produção de ATP e Piruvato. O piruvato é o produto que ao ser produzido entra na mitocôndria com o auxílio do transportador de monocarboxilato (MCT) ou sofre ação da enzima lactato desidrogenase para formação do lactato (arquivo pessoal).

Em seguida, cada molécula de fosfato de gliceraldeído libera H_2 para a formação de difosfato de gliceraldeído. Os fosfatos presentes nessa molécula se ligarão a moléculas de ADP para a formação de 2 moléculas de ATP para cada fosfato de gliceraldeído (BOLAÑOS et al., 2009). Dessa forma, com a perda de fosfato, o gliceraldeído se transforma em piruvato, uma molécula com 3 carbonos (3C) que consegue entrar na mitocôndria através do transportador de monocarboxilato (MCT) (Fig. 5) (BERTUZZI, 2008).

Fisiologicamente, na maioria das células de mamíferos, a presença de oxigênio é determinante para que ocorra a fosforilação oxidativa. No entanto, a conversão do piruvato, produzido na glicólise, em acetil-coenzima A (acetil-CoA) ocorre no ciclo do ácido cítrico. Etapa que antecede a fosforilação oxidativa (ROLF; BROWN, 1997). O piruvato, ao entrar na mitocôndria, sofre ação da coenzima A (CoA), transformando em Acetil-coA, com 2C. Essa etapa determina a liberação de dióxido de carbono (CO_2) e H_2 . Nesse momento, o ácido oxalacético (4C) interage com a Acetil-CoA, liberando água (H_2O) e CoA, para a formação do ácido cítrico (6C). Este, por sua vez, perde mais um carbono na forma de CO_2 e H_2 para a formação do ácido cetoglutarático com 5C. Aqui, a cadeia se repete de forma semelhante, para a

formação de outros ácidos (ácido succínico (4C) e fumárico (4C)) com liberação de uma molécula de ATP, e em seguida, a formação do ácido oxalacético completando o ciclo (Fig. 6) (TURNER; TURNER, 1980).

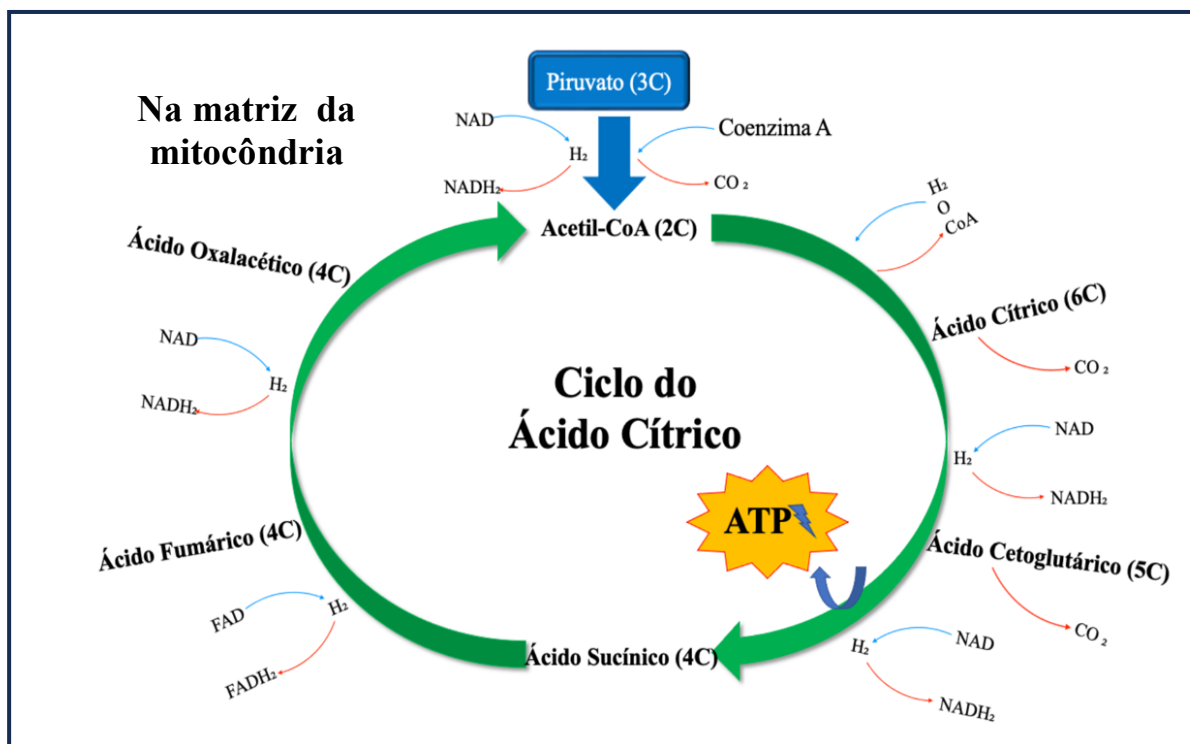


Figura 6 - Esquema ilustrativo da etapa do ciclo do ácido cítrico. O piruvato produzido na glicólise se associa com a coenzima A, formando a acetil-coenzima A (Acetil-CoA). Em seguida uma serie de ácidos são produzidos com a liberação de dióxido de carbono (CO₂) e hidrogênio (H₂) para a liberação de um ATP. O ciclo segue para a formação do ácido oxalacético, o qual servirá para formação do ácido cítrico (arquivo pessoal).

As reações de desidrogenação que ocorrem tanto na etapa da glicólise quanto na etapa do ciclo do ácido cítrico, libera H₂ que vai se ligar à um aceptor temporário de hidrogênio NAD e FAD. Estes, no metabolismo aeróbico fornecem subsídio para o fornecimento de grande quantidade de ATP na etapa de fosforilação oxidativa (TURNER; TURNER, 1980).

Visto que não há condições aeróbicas, em virtude da ausência de suprimento sanguíneo na epiderme e da escassa quantidade de mitocôndrias nas CEBLs, estas células são altamente dependentes da via glicolítica para atender às suas necessidades energéticas e obrigatoriamente, a fermentação da glicose é preferencialmente escolhida ao invés da oxidação mitocôndrial. (PASS et al., 1998; FRENCH; POLLITT, 2004).

Seguindo essa rota, o lactato deixa de ser um produto residual e passa a ser considerado intermediário metabólico que, sob condições aeróbicas, pode contribuir para produção de energia em diversos órgãos, em especial, os cascos (BROOKS et al., 1999; SCHURR et al., 2001).

Todavia, estas células permanecem metabolicamente ativas e consomem energia para seu papel fundamental, que é a manutenção do aparato suspensório da falange distal. Existem evidências de que, no caso de privação ou redução da oferta de glicose, as estruturas que compõe o citoesqueleto e aderência à membrana basal tornam-se desorganizadas, mudando as características fenotípicas do tecido epidermal (FRENCH; POLLITT, 2004). Entretanto, tal processo não é ainda bem conhecido.

4. CAUSAS E FASES DA LAMINITE

Muitas são as causas de laminite, tendo como origem, uma doença preexistente. Ou seja, na maioria das vezes, trata-se de uma complicação importante à uma doença primária. No entanto, estas foram divididas em grandes áreas com relação à sua origem, sendo elas de suporte de peso, endocrinopática e séptica. Existe também a laminite de causa primária, como concussões diretas ou exercícios extenuantes, ocasionando falha no aparato suspensor da falange distal, e as laminites relacionadas a problemas congênitos, com deficiências de desmossomos e hemidesmossomos, que refletem em baixa incidência epidemiológica (FRENCH; POLLITT, 2004).

Das causas secundárias, a laminite de suporte excessivo de peso é decorrente de problemas ortopédicos, que incluem fraturas e infecções. Tal problema faz com que o paciente desloque maior parte do peso sobre o membro sadio, levando à sobrecarga nas estruturas do aparato suspensor da falange distal nesse membro (GARDNER et al., 2017).

Quando o paciente está acometido por uma desregulação hormonal, como nos casos de síndrome de Cushing, com adenoma na *pars intermédia*, ou desregulação insulínica em cavalos obesos, eles apresentam fatores de risco para o desenvolvimento de laminite através de mecanismos complexos, culminando na alteração fenotípica das lamelas dermo-epidérmicas no casco (JOHNSON et al., 2004; ASPLIN et al. 2007).

Em se tratando de problemas sépticos, como pneumonias, cólicas e endometrites, o paciente acometido libera grande quantidade de PAMP e DAMP decorrentes da doença em si. Através desse mecanismo, a SIRS se desenvolve, desencadeada pela infiltração leucocitária, com liberação de citocinas inflamatórias (TADROS et al., 2013), quimiocinas e as cicloxigenases promovendo lesão remota em vários órgãos, inclusive no aparato suspensor da falange distal, pela migração e adesão leucocitária no tecido (EADES, 2010). Essa síndrome, aos poucos revela uma disfunção em múltiplos órgãos (MODS), finalizando com o colapso destes

(síndrome da falência de múltiplos órgãos – MOFS). Não restam dúvidas que as lamelas dermo-epidérmicas do casco são as mais sensíveis (FALEIROS et al., 2011a).

Naturalmente, os membros torácicos suportam cerca de 60% do peso corporal (Fig. 7). Independente da causa, a dor é o principal sinal demonstrado pelos diversos movimentos e posições antiálgicas, que variam de alternância de apoio, deslocamento do centro de massa, relutância em deambular e decúbito (Fig. 8). Invariavelmente, os membros torácicos são os mais acometidos, com a falange distal deslocada pela perda da conectividade com a parede interna do casco, ocasionando compressão da sola, o que torna essa condição extremamente dolorosa para o equino carregar seu próprio peso. Desse modo, o desenvolvimento da doença cursa com um período prodrômico, uma fase aguda e outra fase crônica (FALEIROS et al., 2011b).

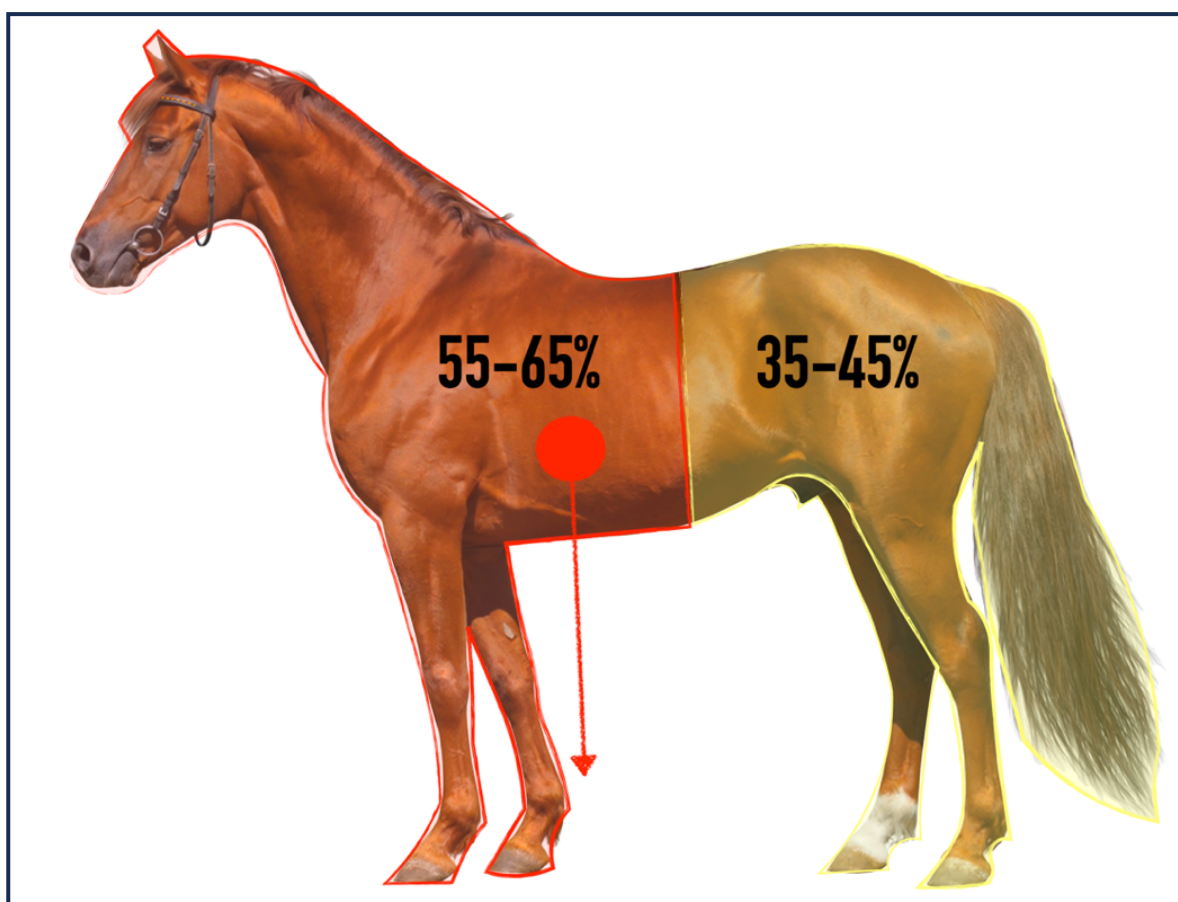


Figura 7 - Proporção de peso sobre os membros torácico e pélvico e o centro de massa indicado pela seta vermelha em equino normal (arquivo pessoal).

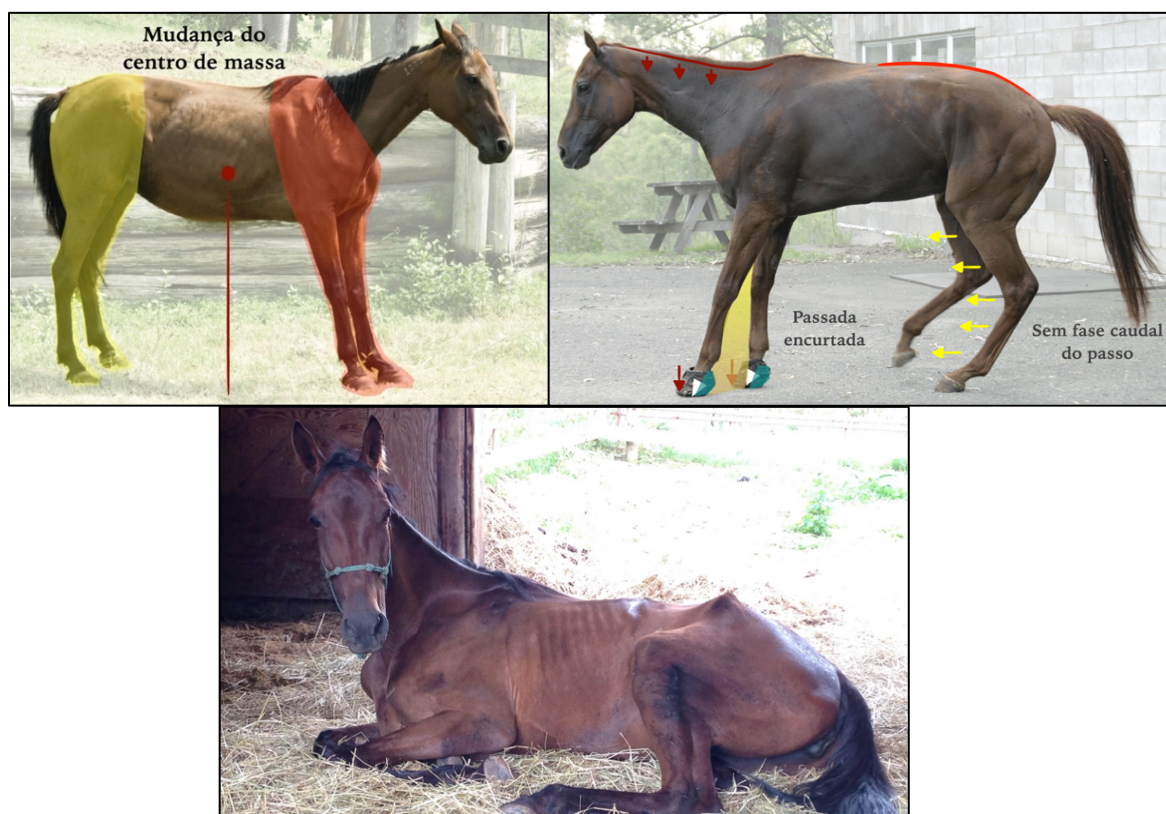


Figura 8 – A: equino deslocando o centro de massa para trás, em posição antiálgica. B: equino com fase caudal reduzida, arqueamento da região lombo sacra, atrofia de músculos do pescoço e passada encurtada; C: animal em decúbito esternal, com baixo escore corporal e presença de escaras de decúbito (Pollitt, 2016).

4.1. Período prodrômico, fase aguda e crônica da laminite

A fase prodrômica compreende o início do insulto primário até o aparecimento dos sinais clínicos. Mesmo que não haja qualquer sinal clínico da laminite, os processos que envolvem a falha lamelar já se iniciaram. A duração desta fase é variável, a depender da capacidade do insulto primário e do indivíduo em gerar SIRS (HOOD, 1999).

Com exceção das anomalias congênitas, sabe-se que a laminite é uma doença predominantemente de cavalos adultos, sendo bastante incomum a ocorrência dessa em potros com menos de um ano (HOOD, 1999). Isso proporciona ao examinador gerenciar o potencial grupo de equinos adultos, que em meio a um processo patológico, de origem inflamatória ou séptica, caracterize um potencial risco para o desenvolvimento da laminite, visto que esta fase é o período mais oportuno para se instituir uma terapêutica (VAN EPS, 2017).

Na fase aguda, uma resposta dolorosa pode ser capaz de alterar os parâmetros sistêmicos como frequência cardíaca, frequência respiratória e sudorese. Os aumentos sutis, mas sustentados na frequência cardíaca (45-55 bpm), podem ser notados antes do desenvolvimento da claudicação,

sendo possivelmente esses os primeiros sinais clínicos observados, mesmo em repouso, juntamente com o aumento da frequência respiratória (NAVAS et al., 2013). Sudorese espontânea e temperatura retal na faixa superior da normal (ou hipertermia leve) podem ser aparentes, embora a laminite por si só não cause pirexia verdadeira (MOGG; POLLITT, 1992).

O aumento da temperatura na parede do casco geralmente precede a claudicação. Deve ser lembrado que este aumento ocorre em função da temperatura ambiente, bem como da perfusão sanguínea e da taxa metabólica dos tecidos subjacentes do dígito. Esse aumento pode perdurar toda a fase aguda da laminite (ROSENMEIER et al., 2012).

A fase aguda segue com o aparecimento dos primeiros sinais de claudicação e termina quando há evidência radiográfica ou física de deslocamento da falange distal. Dessa forma, os principais sinais característicos são: a claudicação, que no início trata-se apenas da alternância incessante de apoio dos membros na postura, aumento na temperatura do casco e no pulso digital. Pode ou não haver resposta dolorosa à percussão da parede do casco e ao pinçamento da sola durante o teste com a pinça de casco (HOOD, 1999; VAN EPS, 2017).

A avaliação comportamental pode fornecer evidências adicionais do grau de dor nos casos de laminite. As mudanças comportamentais atribuídas à dor são observadas através de uma inspeção cuidadosa do cavalo em repouso. Isso pode revelar mudanças sutis de deslocamento de peso, principalmente nos membros torácicos (Quadro 1), representando um sinal clínico precoce característico da laminite (OBEL, 1948).

Quadro 1 - Características dos quatro graus de Obel usados para definir claudicação relacionada a laminite (OBEL, 1948).

Grau Obel	Característica
1	<i>Não há claudicação evidente ao passo, mas o cavalo troca de apoio frequentemente em intervalos de poucos segundos.</i>
2	<i>O cavalo se movimenta voluntariamente, mas a marcha é forçada e é possível erguer um membro sem maiores dificuldades.</i>
3	<i>O cavalo se move com relutância e resiste vigorosamente as tentativas de erguer o membro contralateral.</i>
4	<i>O cavalo recusa a mover-se e só o faz quando forçado.</i>

A frase crônica se caracteriza pelo colapso mecânico das estruturas de suporte da falange distal, ocorrendo graus variados de deslocamento, rotação e afundamento dessa. Tal problema está associado à variável grau de claudicação e desarranjo anatômico (HOOD, 1999).

O afundamento pode ocorrer pelo enfraquecimento e falha do aparato suspensor da falange distal, resultando em deslocamento distal da falange distal dentro da cápsula do casco. Nos casos mais graves de deslocamento, a parede do casco pode separar-se do tegumento, ao nível da banda coronária, tendo como principal sinal detectável o exsudato serossanguinolento de uma rachadura parcial ou circunferencial da borda coronária. prevê a separação catastrófica e exungulação do casco (POLLITT, 2016). Isso ocorre pela tração do tendão flexor digital profundo, que exerce uma força no sentido distal-proximal, levando o aspecto palmar/plantar da falange distal, distanciando da parede dorsal do casco. As papilas dérmicas mudam sua orientação ao nível de banda coronária, resultando no crescimento deformado do casco, representado por anéis visíveis em sua parede dorsal (Fig. 9 e 10) (POLLITT, 2016).

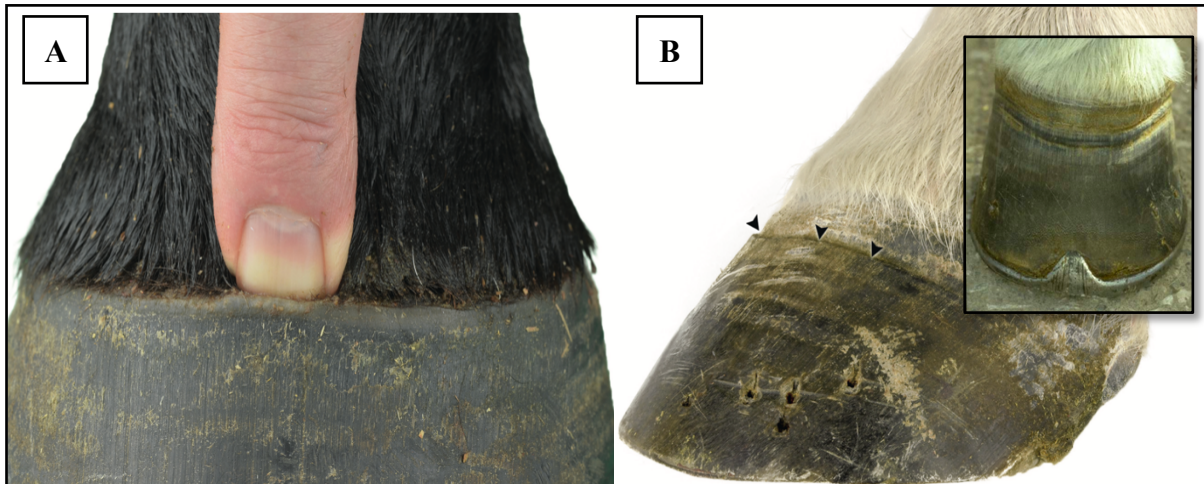


Figura 9 - A - imagem apresentando o rápido desenvolvimento da laminite grave, demonstrado pela palpação da banda coronária e evidenciado pelo afundamento das estruturas esqueléticas dentro do casco; B - imagem apresentando os sulcos na muralha (cabeça de seta preta) na muralha do casco de equinos com laminite (imagem Pollitt, 2016).

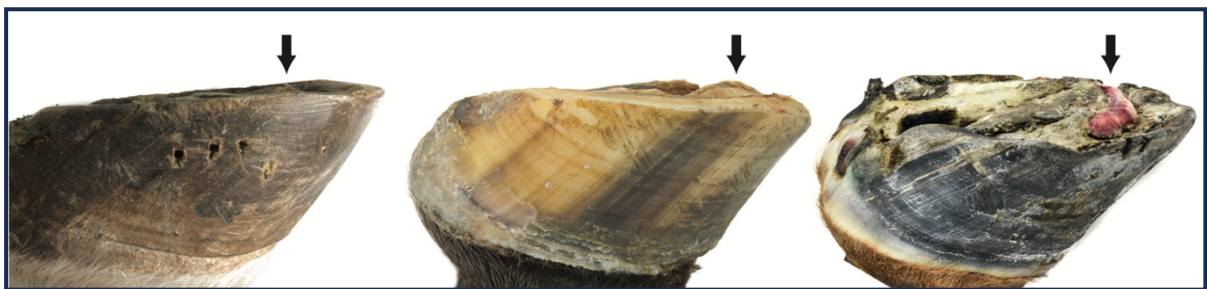


Figura 10 - Sequência de imagens mostrando a progressão da laminite crônica formando protuberância convexa e perfurando a região de sola (setas pretas), pela rotação da falange distal.

5. PATOFISIOLOGIA DA LAMINITE DE ORIGEM INFLAMATÓRIA

Embora os cascos dos equídeos estejam adaptados às exigências do meio externo, a destruição de sua microestrutura pelo processo patológico da laminite tem consequências desastrosas para a sobrevivência do indivíduo acometido. Trata-se de uma doença musculoesquelética debilitante que afeta as junções lamelares de equinos, levando a alterações estruturais. Isso se traduz em dor e desenvolvimento de uma claudicação característica (NOSCHKA et al., 2009). Além disso, a doença é frequentemente associada a condições inflamatórias como obstrução intestinal por estrangulamento, colite, enterite, sobrecarga de grãos, retenção de membranas fetais e pleuropneumonia (NOSCHKA et al., 2009).

Nesse contexto, a patogênese da sepse traz consigo um fato que ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que a resposta inflamatória é a chave para o desenvolvimento da lesão associada à sepse (LEISE, 2017). Assim, a inflamação pode ser propriamente referida como cascata inflamatória, onde uma longa cadeia de reações e atividades celulares se manifestam para reparar o tecido em muitas situações da vida (Fig. 11) (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

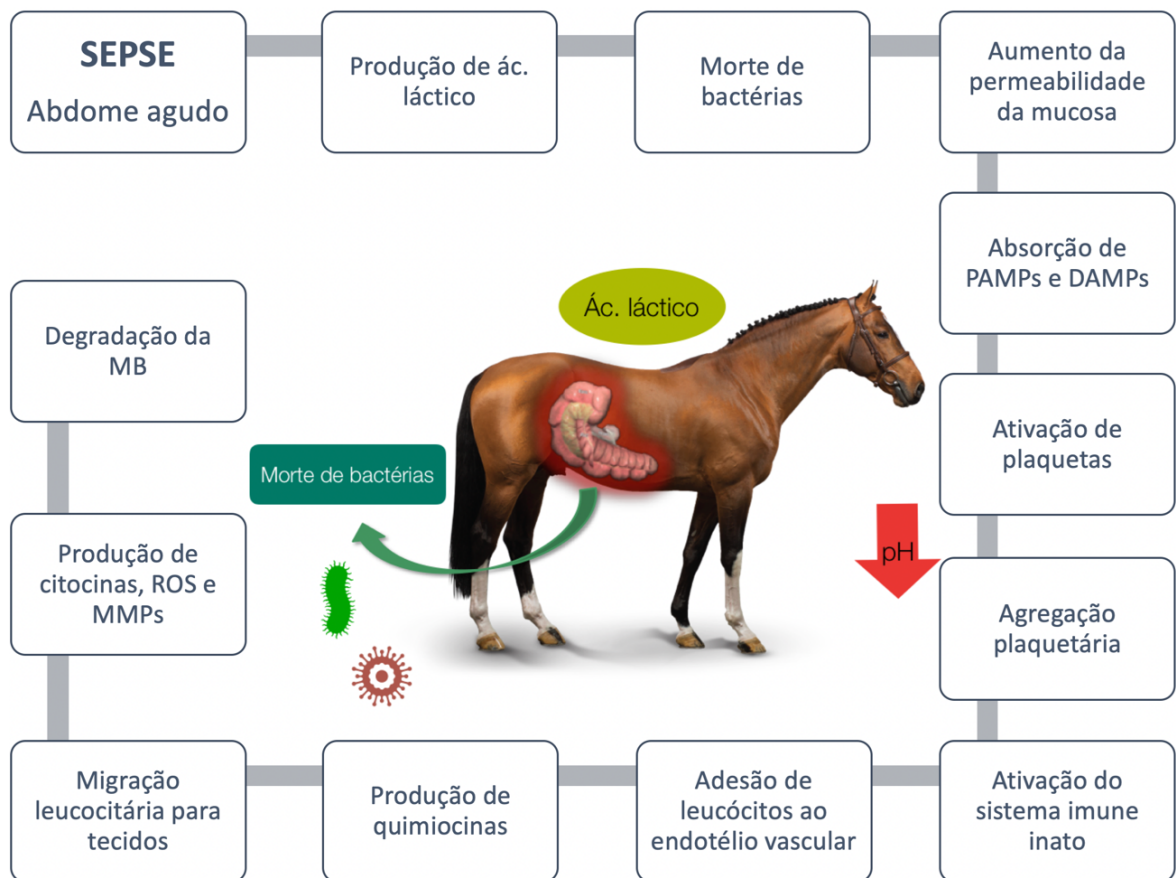


Figura 11 - Esquema ilustrando o equino com síndrome cólica onde ocorre a mudança de pH, pelo acúmulo de ácido láctico, na câmara fermentativa, levando a morte de microorganismos, em especial Gram-negativas, com lesão na mucosa do ceco e absorção de PAMPs e DAMPs, os quais vão ativar o sistema imune inato e degradar a membrana basal (Catunda, 2019).

As reações em cadeia se manifestam na forma dos sinais clássicos da inflamação representado por dor, rubor, calor, edema e perda da função. Tais sinais são reflexos de observações de vasodilatação periférica (rubor), extravasamento vascular (inchaço) e febre (calor). Essas reações são importantes pois atuam manifestando uma defesa essencial do hospedeiro contra microorganismos (MOs) invasores (SHEATS, 2019).

Dessa forma, em mamíferos, a primeira linha de defesa contra MOs é uma barreira física, seja epitélio intestinal, muco, cílios ou pele. Essa barreira é capaz de repelir a maioria dos microorganismos presentes no ambiente. No entanto, quando essa se torna permeável por meio de alguma lesão, a vasodilatação, extravasamento vascular e a dor são liberadas mediante fatores humorais, para o recrutamento de células do sistema imune, que quando ocorre de forma exacerbada, gera uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (SHEATS, 2019).

Essa resposta vem através do sistema imune inato que é a segunda linha de defesa contra MOs. Esse sistema está presente em todos os indivíduos e responde rapidamente ao patógeno, onde na maioria dos casos essas respostas imunes são suficientes para debelar uma infecção. No entanto, ele não conta com memória de longo prazo ou especificidade seletiva contra patógenos, deixando essa função para o sistema imune adaptativo (MOORE; VANDEPLAS, 2014).

As afecções geram componentes de uma SIRS como os lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Esses são componentes integrais da parede celular de bactérias Gram-negativas, que possui uma porção biologicamente ativa, o lipídio A. Essa porção é responsável pela estimulação das células inflamatórias. O lipídio A é um dissacarídeo de glicosamina fosforilado ligado a até 6 ácidos graxos hidrofóbicos, que ancoram a molécula de LPS na membrana da célula bacteriana, e é responsável por muitos dos efeitos tóxicos das bactérias gram-negativas (LOHMANN et al., 2007).

Uma vez liberado da parede celular das bactérias, o LPS se liga a micelas que se formam no plasma, através de proteínas de ligação ao LPS. Elas se ligam a um receptor chamado CD14. Após essa etapa, o reconhecimento dos patógenos se dá por classes distintas de receptores expressos na superfície de células ou em compartimentos intracelulares. Os receptores do tipo Toll-like são os mais famosos e provavelmente os mais estudados em equinos. Dentre os receptores Toll-like, o que mais chama a atenção é o Toll-like 4 que juntamente com seu receptor acessório respondem a endotoxinas monoméricas (os LPS) (MOORE; VANDEPLAS, 2014).

Os LPS, assim como flagelinas, peptidoglicanos, ácido lipotecóico entre outros, são caracterizados como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), e lesões nos tecidos que levam a rupturas de membranas celulares, promovendo a liberação de componentes celulares, são caracterizados como padrões moleculares associados ao dano (DAMP). O reconhecimento destes padrões pelo organismo envia uma mensagem de alerta para o sistema imune inato que promove o recrutamento da primeira linha de defesa do organismo (FALEIROS; BELKNAP, 2017).

Dentre as funções do sistema imune inato, o recrutamento de fagócitos, em especial neutrófilos e fagócitos mononucleares para a área de dano tecidual é tarefa essencial. Isso é obtido por meio da produção e liberação de mediadores químicos chamados citocinas. Ao fazê-lo, essas citocinas, além de outros mediadores liberados ou expressos pelas células inflamatórias recrutadas, causam os achados clínicos típicos associados à inflamação citado anteriormente (MOORE; VANDEPLAS, 2014).

As respostas imunes à infecção são mediadas por classes distintas de receptores expressos na superfície das células ou em compartimentos intracelulares. Uma vez ativa, a célula libera os mediadores vasoativos na corrente sanguínea (BAILEY et al., 2009). Segundo Loftus (2007), em experimentos conduzidos com modelos de laminite relacionada à sepse, dentre os inúmeros eventos que ocorrem nos estágios iniciais, a desregulação vascular, inflamação, expressão de genes e ativação de metaloproteínas desempenham um papel importante na patofisiologia.

Segundo Leise (2018), cavalos submetidos a modelos de indução de laminite por sepse (extrato de noqueira preta) desenvolvem leucopenia 3-4 horas após a indução. Isso se dá pelo movimento de diapedese da vasculatura para os tecidos. Para Faleiros et al. (2011b), esse fato determina dois eventos celulares importantes para a ativação dos leucócitos: a aderência ao endotélio vascular mediada e a diapedese do endotélio para o interstício. Isso ocorre porque as células da derme expressam o gene IL-1 β que estimulam os leucócitos a produzirem moléculas de aderência ao endotélio vascular (E-selectina e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1)) (FONTAINE et al., 2000).

Após a aderência ao endotélio vascular, os neutrófilos, que correspondem à primeira linha de defesa do sistema imune inato, migram para os tecidos, em especial o tecido lamelar, caracterizando o exemplo mais claro de lesão remota em equinos (Fig. 12). Nas lamelas epidermais, uma população de células de natureza imunológica ou mesmo queratinócitos, tornam-se inflamadas (FALEIROS et al., 2009).

Com isso, além dos neutrófilos, monócitos e macrófagos, uma variedade de células, incluindo células dermais, são potencialmente capazes de sintetizar e liberar citocinas pró-inflamatórias, possuindo papel importante na falha lamelar, pois amplificam a resposta inflamatória (FALEIROS et al., 2011a).

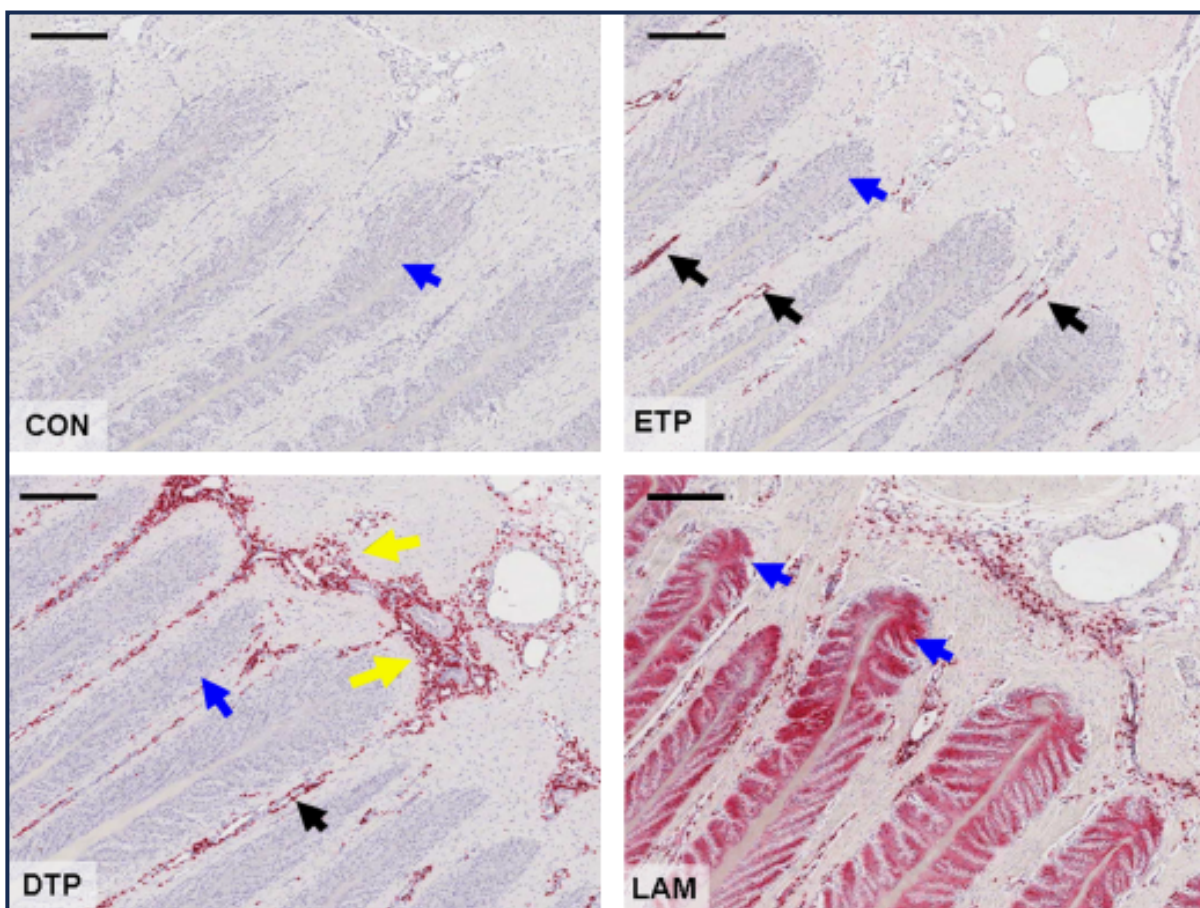


Figura 12 - Microfotografias de tecido lamelar de cavalos com laminite induzida por extrato de noqueira preta (BWE), mostrando a imunolocalização de calprotectina (CP) (vermelho) nos seguintes grupos: controle (CON), ponto inicial (ETP, 1,5 horas após BWE), ponto de tempo de desenvolvimento (DTP, 3–4 horas após BWE) e ponto de tempo de claudicação (LAM, 10–12 horas, após BWE). Observe o número crescente de leucócitos perivascularares no tecido lamelar em pontos de tempo anteriores (começando em ETP, setas pretas) e ao redor dos vasos da derme profunda em pontos de tempo posteriores (começando em DTP, setas amarelas). Observe também o intenso sinal de calprotectina epidérmica no grupo LAM (setas azuis) em comparação com a coloração insignificante na epiderme lamelar no CON ou pontos de tempo BWE anteriores (setas azuis). Barras de escala 5 240 μ m, hematoxilina como contraste (Faleiros et al., 2009).

6. VIA DE SINALIZAÇÃO Akt/mTOR/RPS6 NO METABOLISMO CELULAR

Células e tecidos possuem inúmeras formas de detectar níveis de nutrientes no ambiente, e quando engajadas, medeiam uma série de respostas em cascata e sobrepostas. Um exemplo clássico seria a via da insulina que responde aos níveis de glicose na corrente sanguínea. Nesse contexto, a via TOR (Target of Rapamycin) está intimamente ligada à oferta de nutrientes, em especial, aminoácidos, que promove a ativação da PI3K/Akt/mTOR (STANFEL, 2009).

A sinalização PI3K–Akt–mTOR é o mecanismo chave que as células normais usam para metabolizar a glicose em resposta à insulina (MASUI et al., 2014). Além dos diversos estímulos a via pode ser ativada em resposta a detecção dos estoques de energia celular, com atividade da proteína quinase ativada por fosfato de adenosina (MAPK), pela razão AMP/ATP, para provocar uma resposta celular integrada (HARDIE, 2007; STANFEL et al., 2009).

A MAPK é ativada por AMP, sendo seus efeitos antagonizados pelo ATP. Desta forma, essa molécula funciona como um sensor de energia, realizando a fosforilação protéica, para a ativação ou inibição de diferentes proteínas no citoplasma. A razão AMP:ATP é o indicador mais sensível no status de energia celular. Isso significa dizer que em situações de elevado gasto energético, como por exemplo, durante a exaustão física, o ATP que é a principal fonte de energia é convertido em ADP, pelo processo de desfosforilação. O ADP sofre nova desfosforilação, liberando uma nova quantidade de energia e formando o AMP. Neste contexto, tal conversão de ATP/ADP/AMP implica na redução do estoque energético da célula que promove o aumento da produção de MAPK para reduzir o gasto energético da célula e favorecer a produção de novas moléculas de ATP, reestabelecendo o equilíbrio energético intracelular (HARDIE, 2007).

A MAPK regula a atividade proliferativa em resposta a ambientes desfavoráveis via ERK 1/2, inibindo diretamente a atividade do mTORC1 (Mammalian Target of Rapamycin Complex 1). Durante períodos de privação de energia ou oxigênio, os níveis de AMP aumentam e promovem a ativação da MAPK. Uma vez ativada, a MAPK inibe diretamente o mTORC1, fosforilando o Raptor, que indiretamente inibe o mTORC1, fosforilando o Complexo de Tuberosidade Esclerótica 2 (TSC2), além de aumentar a capacidade do TSC2 de inibir a sinalização do mTOR (JOHNSON et al., 2013).

Em meio às adversidades fisiológicas, em resposta a fatores internos e externos, os mamíferos produzem mTOR, uma proteína que desempenha um papel central em dois complexos de múltiplas subunidades: complexo mTOR 1 (mTORC1) e o mTORC2 (Fig.13). Enquanto o mTORC1 controla principalmente o crescimento celular, o mTORC2 participa da sobrevivência e proliferação celular (POPOVA; JÜCKER, 2021).

O mTORC1 é composto pela própria proteína mTOR, a proteína 8 SEC13 letal para mamíferos (mLST8), também conhecida por proteína GβL, a proteína associada à regulação da mTOR (Raptor) e dois componentes não essenciais, a PRAS40, rico em prolina 1 e a uma proteína de interação com a mTOR (DEPOR). O PRAS40 bloqueia a atividade do mTORC1 até que a

sinalização do receptor do fator de crescimento desbloqueie a inibição do mTORC1 mediado pelo PRAS40 (POPOVA E JÜCKER, 2021).

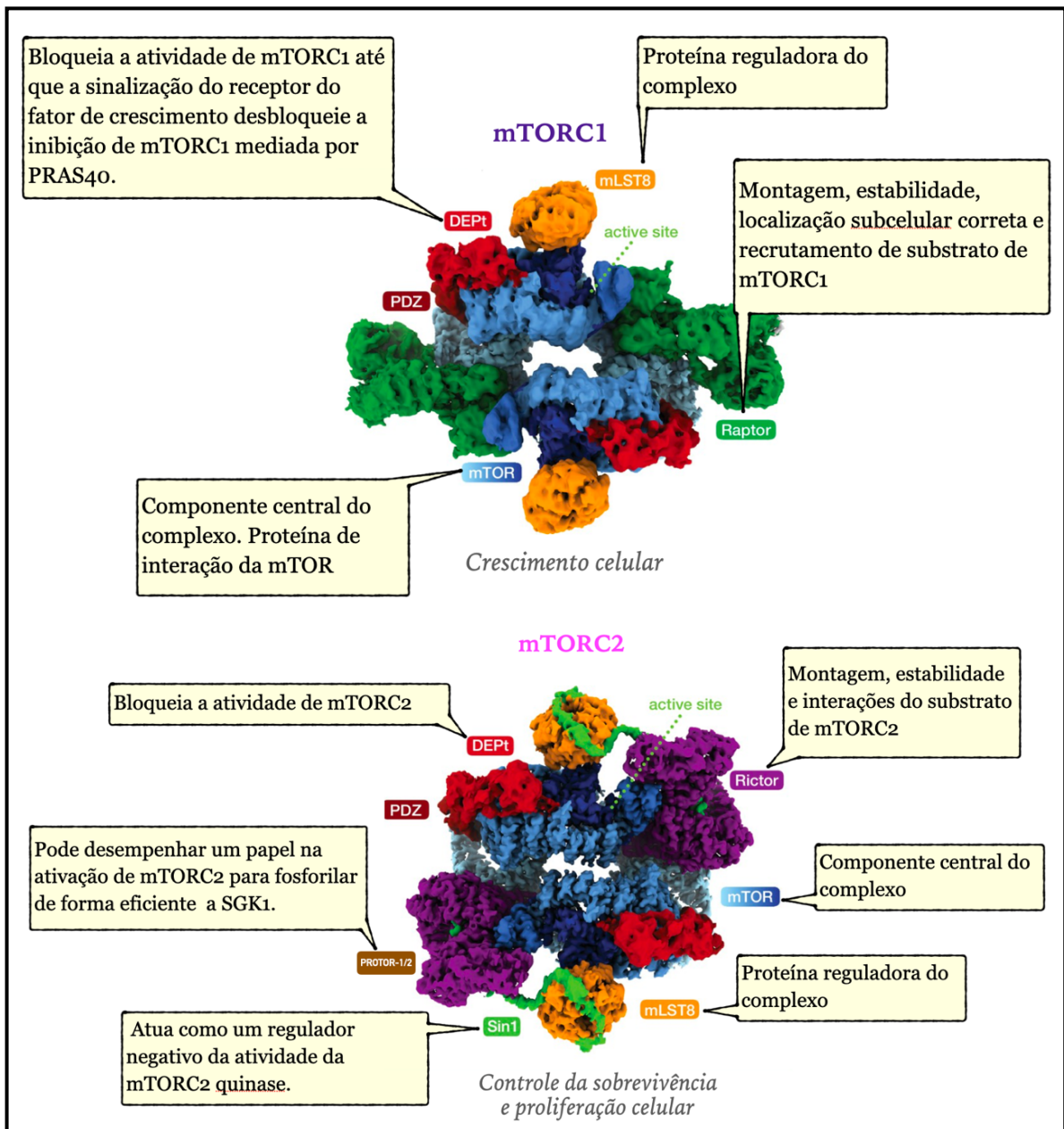


Figura 13 - Ilustração demonstrando as subunidades dos complexos mTOR 1 e 2. Note que no complexo mTOR 1 possui a proteína reguladora Raptor, enquanto no complexo 2 possui a proteína Rictor, que regula a estabilidade deste (arquivo pessoal).

Da mesma forma, o mTORC2 é formado pelas proteínas mTOR e mLST8. No entanto, ele conta com dois componentes específicos essenciais, a proteína insensível à rapamicina do mTOR (Rictor) e a proteína 1 de interação com a MAPK ativado por estresse (mSIN1), atuando como um regulador negativo da atividade do complexo 2. Além disso, mTORC2 está associado à proteína de subunidade facultativa observada com RICTOR (Protor)-1/2 (Fig.13). Esse, pode desempenhar um papel em permitir que o mTORC2 fosforile a quinase 1 ativada por

glicocorticóides (SGK1). Tanto o Raptor quanto o Rictor são necessários para a montagem, estabilidade e interações de substrato dos seus respectivos complexos (MASUI et al., 2014).

Assim que se torna ativado, o mTORC1 regula a tradução de proteínas através de seus substratos S6K1 e 4E-BP1, bem como o metabolismo anabólico no fluxo do fator de crescimento e sinalização PI3K-Akt, ativada por receptor e em resposta aos níveis de nutrientes de aminoácidos (MASUI et al., 2014). Ambas as proteínas são sintetizadas diretamente pelo mTORC1, e atuam favorecendo a produção de proteínas ribossômicas (Fig. 14). A proteína 4E-BP1 atua se ligando ao mRNA para regular o início da tradução da RPS6. Enquanto a S6K1 vai atuar fosforilando a RPS6 (WANG et al., 2022). O mTORC2 é insensível aos níveis de nutrientes, mas responsivo à sinalização do fator de crescimento e funciona principalmente através da ativação de Akt (MASUI et al., 2014; GOMEZ-PINILLOS; FERRARI, 2012).

A biogênese de ribossomos, síntese protéica e angiogênese ocorrem para suportar o crescimento e a proliferação celular. Assim, após a síntese dos substratos S6K1 e 4E-BP1, a proteína ribossomal S6 (RPS6) é sintetizada e fosforilada (GOMEZ-PINILLOS; FERRARI, 2012).

6.1. Proteína ribossomal S6

Os ribossomos de células eucariontes de mamíferos são compostos de duas subunidades, a 40S e a 60S. A subunidade 40S, considerada pequena, é composta de uma molécula simples de RNA, denominado RNA ribossômico (rRNA) 18S, contendo 33 proteínas. Por outro lado, a subunidade grande, 60S, é composta por 3 moléculas de rRNA, 5S, 5.8S e 28S, contendo 46 proteínas. De todas as proteínas ribossômicas conhecidas, a única que sofre fosforilação induzida é a proteína ribossomal S6 (RPS6) (MEYUHAS, 2008).

A RPS6 é um componente da subunidade ribossômica 40S, sendo um substrato fosforilado da S6K, para se tornar p-RPS6, sua versão fosforilada. É uma molécula que tem atraído muita atenção, pois está envolvida na sinalização crucial da via da mTORC1. Atribui-se a essa via, o crescimento celular, a progressão do ciclo celular, a proliferação celular e sobrevivência (MOK et al., 2012).

Ao passo que a biogênese ocorre no nucléolo, inicia-se com a síntese de pré-rRNA através da enzima RNA polimerase, a qual requer o uso de proteínas ribossômicas do citoplasma, para a formação do rRNA maduro. Concomitantemente, os rRNAs são extensivamente modificados e ligados pelas proteínas ribossômicas antes que as subunidades 40S e 60S montadas sejam exportadas separadamente para o citoplasma. Sabendo que a RPS6 é biossintetizada no

citoplasma pela subunidade 40S, ela adentra no núcleo de células imortais (HeLa), através do nucléolo, onde é montada com outras proteínas e rRNA na subunidade 40S (MEYUHAS, 2008).

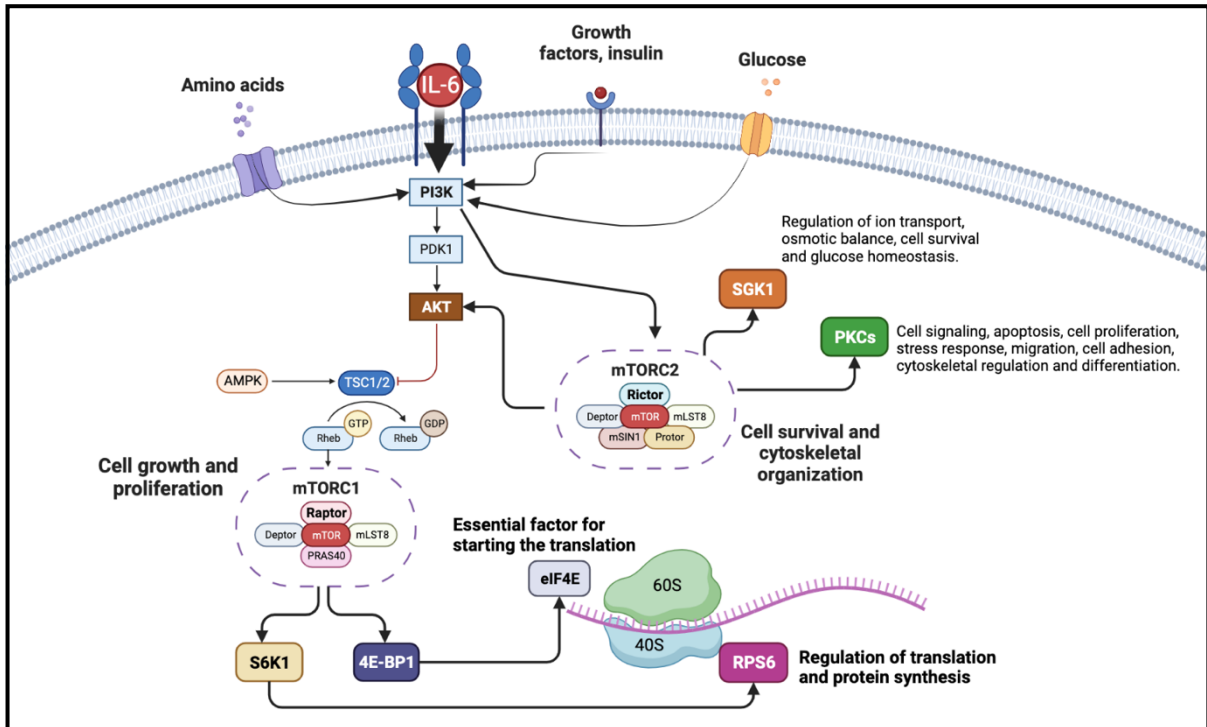


Figura 14 - Esquema demonstrando a via de sinalização intracelular PI3K/AKT/mTOR em resposta a ativação do sistema imune pela produção de interleucina-6 (IL-6). Note que uma vez ativado o complexo da Mammalian Target of Rapamicyn 1 ocorre a produção e fosforilação da proteína ribossomal S6 (RPS6) (arquivo pessoal).

A fosforilação de RPS6 atraiu muita atenção em vários laboratórios desde sua descoberta em 1970 (Gressner; Wool, 1977). Um estudo pioneiro mostrou que uma proteína de 33 kDa, denominada proteína F, que residia na pequena subunidade ribossômica sofre fosforilação em reticulócitos de coelho (KABAT, 1970). Posteriormente, a proteína F foi renomeada como RPS6 e é a única proteína ribossômica que sofre fosforilação durante a regeneração do fígado de ratos (GRESSNER; WOOL, 1977). No entanto, a sua função era apenas especulada até meados dos anos 2000, quando o papel da RPS6 e sua modificação pós-traducional começaram a ser divulgados pelo direcionamento genético do gene RPS6 e das respectivas quinases (VOLAREVIC et al., 2000).

A fosforilação da RPS6 pode ocorrer tanto no citosol quanto no núcleo em resposta a estímulos de natureza variada. A localização da fosforilação no carboxi terminal da RPS6 está bem consolidada nas posições serina 235/236 e serina 240/244/247, em mamíferos. Assim, as células de mamíferos contêm duas formas de proteína ribossomal S6 quinase (S6K) que são codificadas por dois genes diferentes e compartilham um nível muito alto de homologia de sequência geral.

S6K1 tem isoformas citosólica e nuclear (p70 S6K1 e p85 S6K1, respectivamente), enquanto ambas as isoformas S6K2 (p54 S6K2 e p56 S6K2) são especialmente nucleares (MARTIN et al., 2001). Dessa forma, para que ocorra a fosforilação completa da RPS6 é necessário a ação tanto da S6K1 quanto da S6K2 (PENDE et al., 2004).

O gene RPS6KB codifica a enzima S6K que tem como alvo a proteína ribossomal S6. A fosforilação da S6 induz a síntese de proteínas no ribossomo que podem afetar a reorganização da actina e atuar como uma proteína de ligação cruzada de filamentos de actina, que por sua vez estabiliza os filamentos de actina em células cancerígenas, servindo assim como um regulador crucial da dinâmica da actina na progressão tumoral (MOK et al., 2012)

Contudo, pesquisas associaram a ativação da proteína RPS6 a graus de carcinogênese e potenciais metastáticos de neoplasma epitelial (CHAIUPARAT et al. 2013). A perda da rigidez nas células tumorais epiteliais, provavelmente devido a desregulação do citoesqueleto, pode indicar que a RPS6 esteja envolvida na sinalização da transformação morfológica das células epiteliais (DE LAAT et al. 2011).

6.2. Evidência da ativação da via AKT/mTOR/RPS6 no tecido lamelar de equinos

Fisiologicamente, as lamelas epidermais primárias (LEP) e secundárias (LES) possuem formato padrão, em que as LES demonstram se alongadas, com as células basais do epitélio lamelar (CEBLs), em sua maioria, apresentando núcleo ovalado e centralizado, além do seu eixo perpendicular à membrana basal (COTA, 2021). Em modelos experimentais, após 12 horas de indução, a maioria dos núcleos torna se arredondada (70%) e, tanto as LEP quanto as LES, sofrem alongamento com seus ápices pontiagudos. Outra característica observada por Cota (2021), foi o enrugamento da membrana basal e a formação de “teta” no ápice das lamelas, um sinal precoce de desprendimento dessa com a epiderme (Fig. 15).

Com a progressão do tempo (36h), as alterações histopatológicas ficam mais aparentes. Praticamente todos os núcleos das CEBLs ficam arredondados, migrando no citoplasma para posição próxima a membrana basal. As lamelas em sua maioria, tornam se alongadas e afiladas. O enrugamento fica mais severo e ocorre o desprendimento da epiderme na região onde apresenta a formação do teto (Fig. 15). A principal alteração nas lamelas dérmicas é a intensa dilatação dos capilares (COTA, 2021).

Segundo Lane et al. (2017), a sinalização da mTOR/RPS6 lamelar ocorre antes mesmo da falha lamelar. Isso indica o grau de importância dessa sinalização nas mudanças sustentadas pela

desregulação do citoesqueleto das CEBLs que coincidem com a produção de proteínas envolvidas na via de sinalização celular da mTOR e seu complexo, culminando na produção da RPS6 (DERN et al., 2020; LANE et al., 2017).

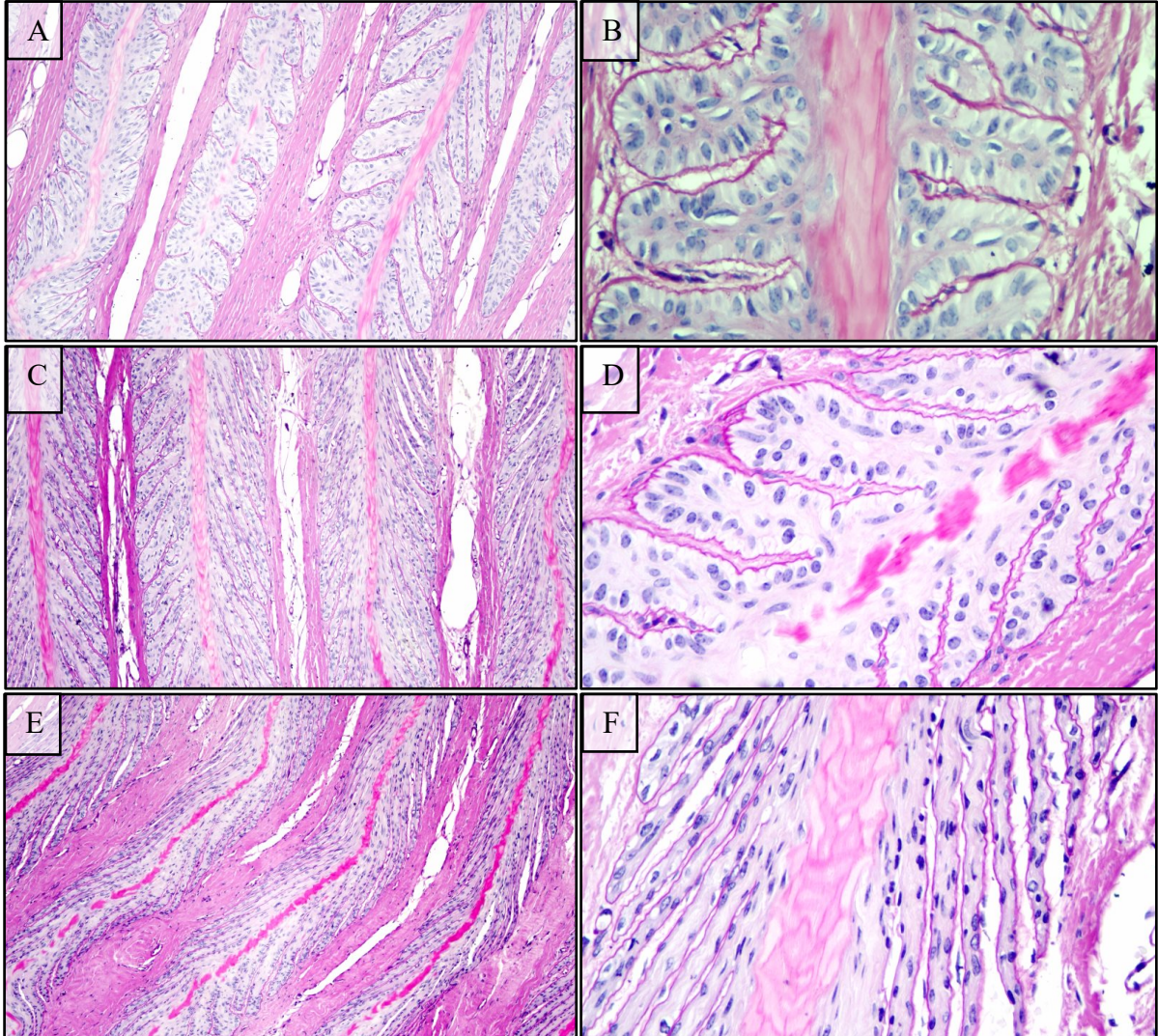


Figura 15 - Microfotografia de lamelas epidérmicas de casco de equinos submetidos ao modelo de indução de laminite por oligofrutose. Coluna da esquerda imagens com objetiva de 10x. Coluna da direita imagens com objetiva de 40x. A e B demonstra lamelas epidérmicas normais, com núcleos das células epitélio basais lamelares (CEBLs) fusiforme e membrana basal íntegra. C e D – tempo 12h de indução de laminite por oligofrutose. Imagens demonstrando o alongamento das lamelas primárias e secundárias, grande parte dos núcleos das CEBLs em formato arredondados e início do desprendimento da membrana basal. E e F – tempo 36h de indução de laminite por oligofrutose. As imagens demonstram um alongamento exacerbado das lamelas primárias e secundárias, maioria dos núcleos arredondados. É possível observar muitas áreas de desprendimento da membrana basal. Cortesia Cota (2021).

Tal mudança fenotípica promove perda da conectividade das junções lamelares (LANE, 2017), e uma vez perdida a integridade dessas estruturas (Fig. 16), o resultado catastrófico é o deslocamento da falange distal, que eventualmente afunda e/ou rotaciona em seu eixo transversal, chegando, em casos mais graves, a perfurar a sola queratinizada do estojo córneo (LEISE, 2018).

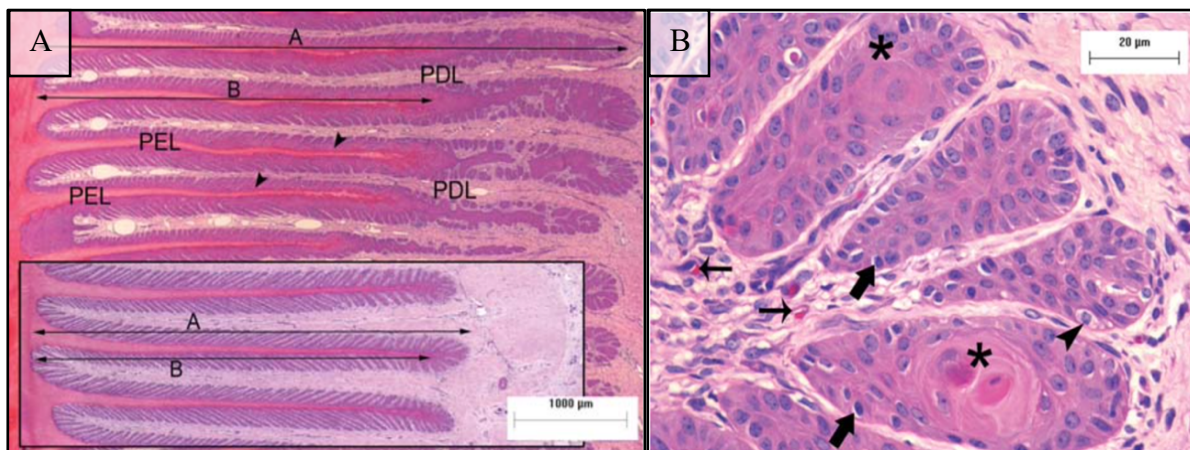


Figura 16 - Microfotografia das lamelas do casco anterior esquerdo 7 dias após a indução da laminite. A) A inserção, na mesma ampliação, mostra as lamelas do cavalo de controle normal. As LEPs afetados pela laminite são mais longos que o normal. O eixo queratinizado dos LEPs é relativamente inalterado, mas em ambos os lados há colunas anormais de células epidérmicas parcialmente queratinizadas (setas). Linha A = comprimento lamelar epidérmico total. Linha B = comprimento lamelar epidérmico primário queratinizado. LDP = lamela dérmica primária. B) Porção axial lamelar após 7 dias de indução da laminite. A maioria das células epidérmicas que formaram ilhas isoladas ligadas a MB assemelham-se às células basais de LESs normais. Alguns têm núcleos picnóticos escuros (seta) e há células ocasionalmente vacuolizadas (cabeça de seta). Capilares estão presentes (pequenas setas) nas bases das ilhas CEB. Agregados redondos de células queratinizadas estão presentes em algumas das ilhas (asteriscos). Coloração = hematoxilina e eosina (Van Eps e Pollitt, 2009).

7. INTERLEUCINA 6 (IL-6)

As citocinas são moléculas importantes na resposta inflamatória. Elas vão atuar buscando a reparação tecidual diante de um processo inflamatório/infeccioso. No entanto, em meio ao caos de uma SIRS, a produção exacerbada de citocinas conduz à instabilidade hemodinâmica (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Essa instabilidade é adquirida com a expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular como a ICAM-1 e E-Selectina (GOMES et al., 2009). Com isso, uma grande produção de radicais livres de oxigênio (ROS), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), podem promover destruição nos tecidos (FALEIROS et al., 2011a).

Sabe-se também, que essas citocinas coletivamente possuem a capacidade de promover câncer, incluindo proliferação, angiogênese e metástase, ao mesmo tempo em que induzem resistência de células neoplásicas a estímulos de morte e destruição imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A IL-6 é uma citocina que atua tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Embora se pense que a sinalização clássica de IL-6 representa um mecanismo de defesa (por exemplo, contra patógenos), a sinalização de IL-6 tem sido sugerida como um importante mecanismo patogênico envolvido na transição da inflamação aguda para crônica (SCHELLER et al., 2011; SCHREIBER et al., 2021).

Após o reconhecimento de lipopolissacarídeos por receptores do tipo Toll-like 4, ocorre a ativação citosólica do Fator Nuclear kappa B (NFκB). Essa ativação é importante pois o NFκB controla a transcrição do DNA, produção de citocinas e sobrevivência celular. Além de ser encontrado na maioria das células animais, ele está envolvido em respostas celulares induzidas por estresse, citocinas, metais pesados, radiação ultravioleta e inicia um papel chave na resposta imune a infecção (KARIN, 1999).

A IL-6 é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células, em resposta a MOs ou por outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF-α (GOMES et al., 2009). Nesse contexto da inflamação, ela destaca, pois é uma citocina com ação pleiotrópica essencial para a regulação da resposta imune, hematopoiese e reações de fase aguda. A execução de sua função está vinculada a um receptor heterodimérico composto por duas glicoproteínas ligadas a membrana, a IL6R-alfa e a gp130 (IL-6ST) (HIRANO et al., 1989).

Essa citocina possui quatro hélices (Fig.17) e participa da sinalização celular ligando-se a um receptor de IL-6 presente na membrana (IL-6R) (Fig. 18). O complexo ligante (IL-6 e IL-6R) associa-se a uma segunda proteína receptora, a glicoproteína 130 kDa (gp130), que dimeriza e inicia a sinalização intracelular da via JAK/STAT (ROSE-JOHN, 2020). Apenas as células que expressam o IL-6R podem se ligar a IL-6. Deste modo a citocina é incapaz de se ligar diretamente ao gp130, sendo necessário o complexo para induzir sua dimerização. Esse fato limita a ação do complexo a alguns tipos celulares como leucócitos e hepatócitos, sendo o gp130 expresso em praticamente todos os tipos celulares (ROSE-JOHN, 2022).

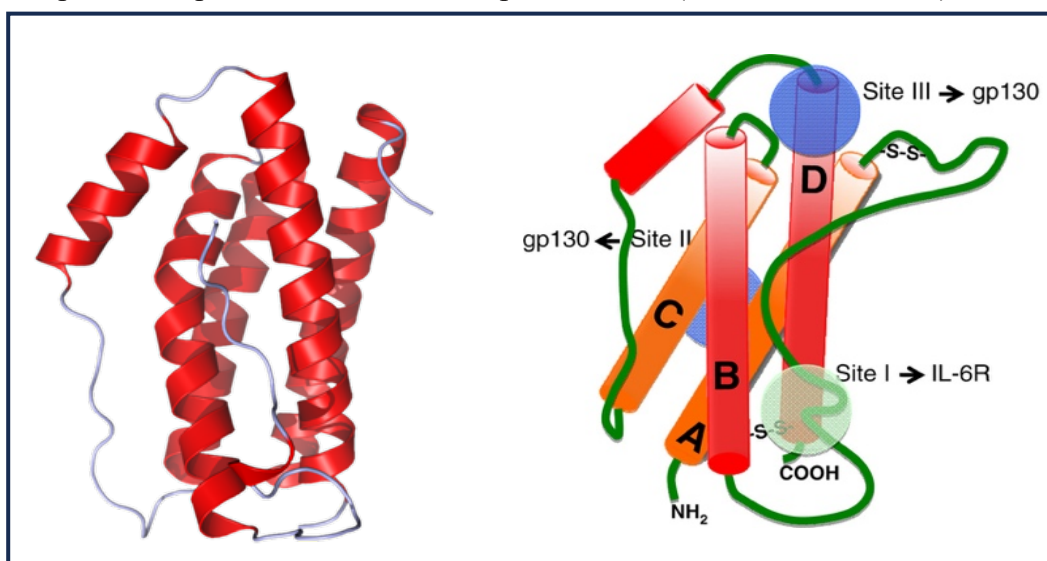


Figura 17 - A esquerda a imagem demonstra a molécula de interleucina 6 (IL-6) em formato tridimensional apresentando 4 hélices (A, B, C e D). A direita a mesma molécula demonstrando suas porções ligantes. Note que a molécula possui 3 locais de ligação, sendo o local I para interagir com o receptor de interleucina 6 e os locais II e III para a glicoproteína 130 (gp130) (retirado e adaptado de Tanaka et al., 2013).

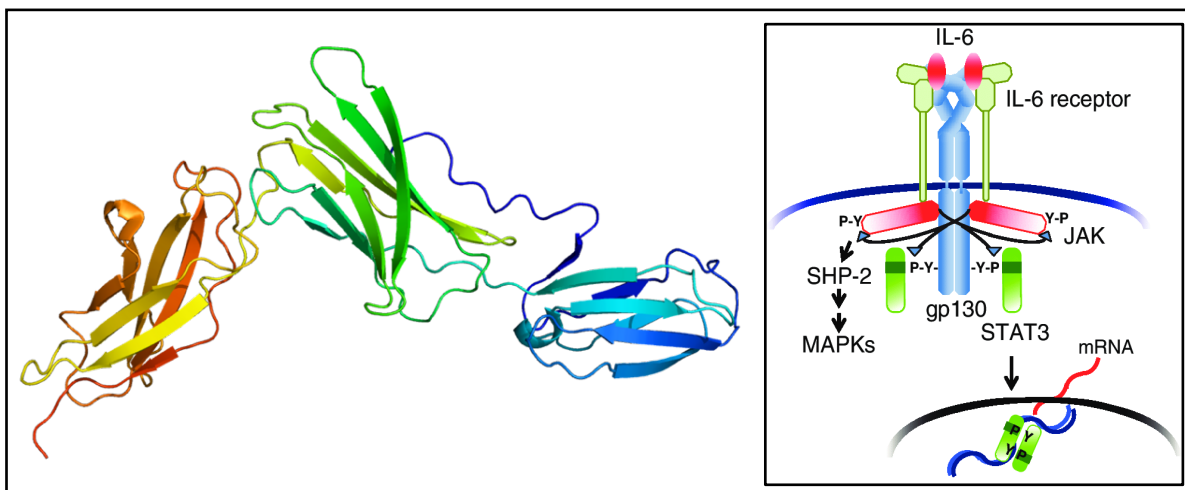


Figura 18 - Molécula tridimensional do receptor de interleucina-6. Esquema ilustrativo do complexo citocina (IL-6) e receptor (IL-6R) associado a glicoproteína 130 (arquivo pessoal).

No entanto, sabe-se que em humanos, o IL-6R pode sofrer clivagem proteolítica por metaloproteínas, através de um processo de tradução do mRNA com splicing alternativo, para produzir um receptor de IL-6 solúvel (sIL-6R), o qual confere a capacidade de se ligar à citocina e se associar ao gp130 e induzir sinalização, mesmo em células que não possuem o IL-6R ligado à membrana (MACKIEWICZ et al., 1992).

8. VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3

O fator de transcrição e ativação de sinal de transdução 3 (STAT3) é um dos sete membros da família STAT (STAT1-3, STAT5 α , STAT5 β e STAT6). Esses fatores de transcrição integram a sinalização de citocinas e fatores de crescimento para regular uma grande variedade de processos celulares (BENERJEE; RESAT, 2016). Todos os membros da família apresentam seis domínios estruturais distintos: N-terminal, coiled-coil, de ligação ao DNA, SH2 (Homólogo a Src 2), de transativação e C-terminal (Fig. 19), este último contém um resíduo crítico de tirosina que pode ser fosforilado (VINKEMEIER et al., 1996).

Como a inflamação é uma característica importante na patogênese de muitas doenças, diversos tipos de câncer têm como característica fundamental a sinalização da proteína STAT3. Além de estar envolvido na sinalização do câncer, a STAT3 também pode ser encontrada na psoríase, uma doença que envolve uma condição inflamatória crônica da pele. O viés do envolvimentogenético associado a fatores ambientais como trauma e infecções em sua patogênese, desencadeia uma resposta de ambos os sistemas imunes, inato e adaptativo (KASHIMOTO et al., 2021).

Dada essa importância, a IL-6 ganha destaque no papel da sinalização de mediadores inflamatórios (BROMBERG; WANG, 2009). Em 1993, essa proteína foi identificada pela primeira vez, por um grupo de pesquisadores liderados por Wegenda. Eles observaram que a molécula de interleucina 6 induzia rapidamente a ativação de um fator de ligação ao DNA. Posteriormente esse fator foi denominado de Fator de transcrição e ativação de sinal de tradução (STAT) (TOLOMEO; CASCIO, 2021).

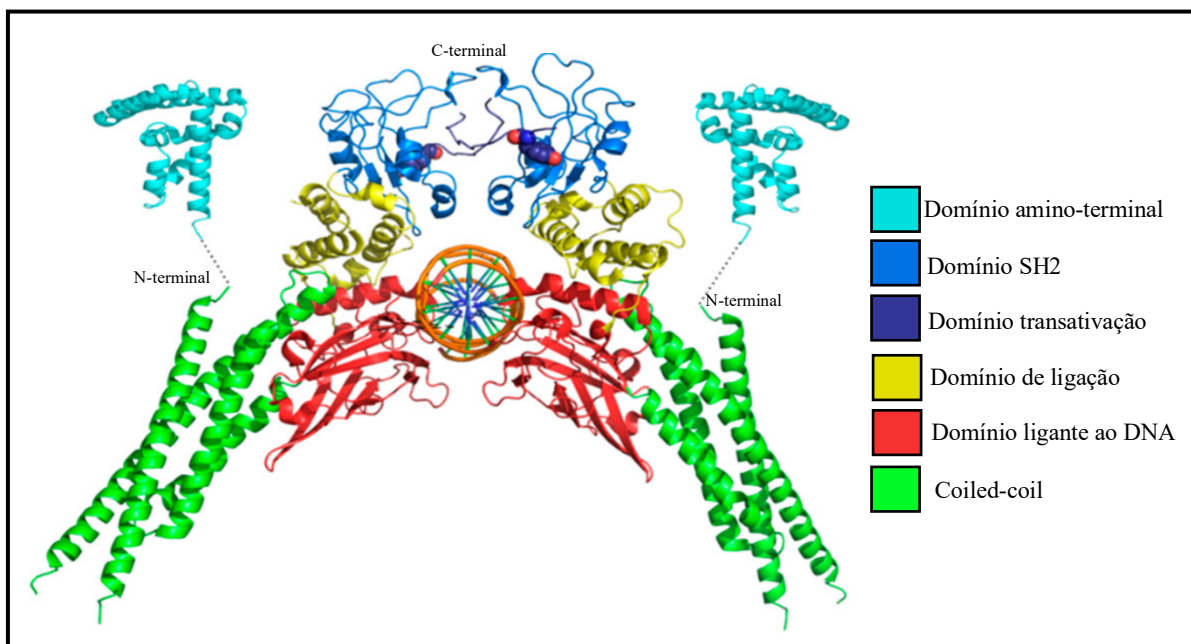


Figura 19 - Molécula STAT3 dimerizada demonstrando os domínios expressos pelas cores e suas porções terminais (Adaptado de Sgrignani et al., 2018).

Funcionalmente, a secreção de IL-6 ou IL-8 de forma autócrina ou parácrina, são fundamentais para o crescimento independente de ancoragem e à resistência a apoptose (BANERJEE; RESAT, 2016). Nesse contexto, receptores de membrana gp130 identificam membros da família IL-6 e várias outras citocinas, fatores de crescimento, oncoproteínas e hormônios como a leptina. Isso promove a ativação das proteínas STAT no citoplasma por Janus quinases (JAKs) (Fig. 20) (CHUNG et al., 1997).

As JAKs correspondem a uma família de tirosina quinases intracelulares não receptoras que traduzem sinais mediados por citocinas através da via JAK-STAT. O nome dado é inspirado no Deus romano Jano, que apresentava duas faces representando o começo e as mudanças. Analogamente, as JAKs possuem dois domínios de transferência de fosfato quase idênticos.

Um domínio exibe a atividade de quinase, enquanto o outro regula negativamente a atividade de quinase do primeiro (BANERJEE; RESAT, 2016; TOLOMEO; CASCIO, 2021).

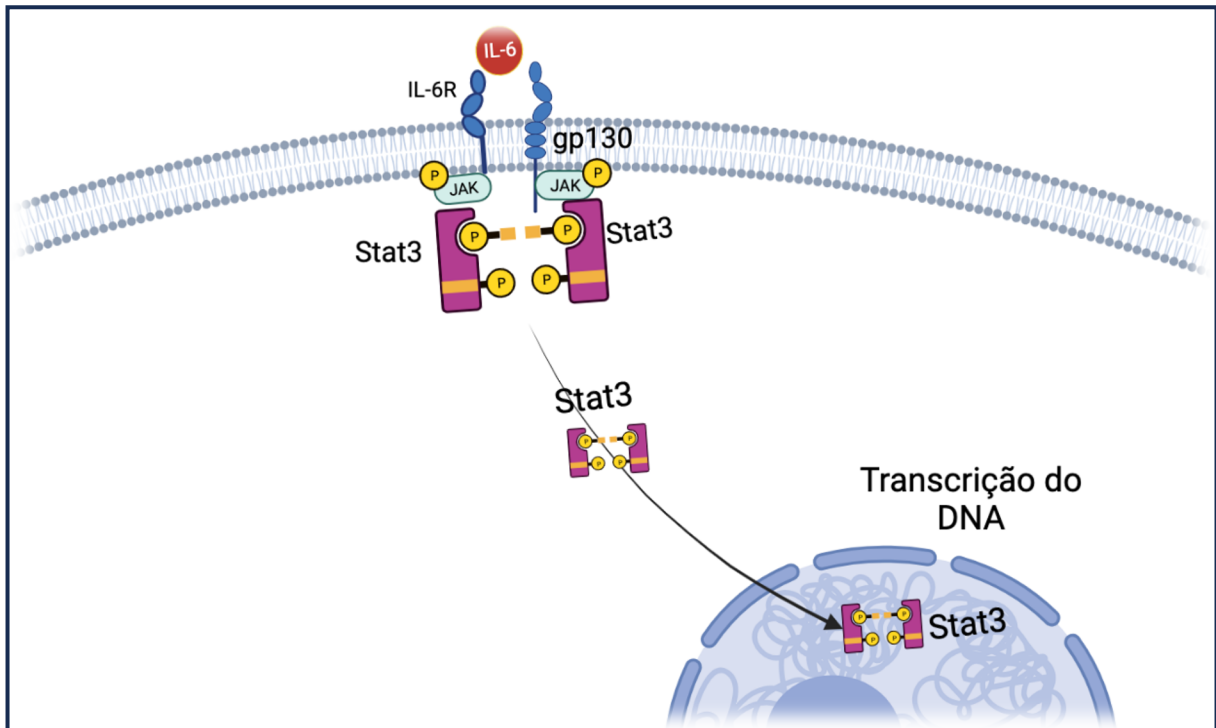


Figura 20 - Esquema da cascata de eventos de sinalização celular da via JAK/STAT3. Note que após a estimulação de receptores de IL-6 ocorre o recrutamento de moléculas glicoproteína-130, Janus Kinase e STAT3 do citoplasma para a membrana celular. Essas moléculas sofrerão fosforilação de tirosinas, ativando a STAT3, para que esta siga para o núcleo, ligando ao DNA e promovendo a transcrição dele (arquivo pessoal).

Uma vez iniciada a cascata de eventos, a sinalização inclui o complexo regulatório de remodelação do citoesqueleto de actina, ativação de proteínas quinases (PAKs e MAPK, e fatores de transcrição NF κ B, Wnt/ β -catenina/STAT3). A regulação positiva ocorre através da ativação do gene Rac 1 e produção de pré RNAm para a produção de transcritos de Rac 1, pelo processo de splicing. Trata-se de uma GTPase que tem sua atividade regulada positivamente pelos fatores de trocas de nucleotídeos de guanina do modo inativo GDP para o modo ativo GTP (KOTELEVETS; CHASTRE, 2020).

Em seguida, a fosforilação da STAT3 na posição tirosina 705, ocorre a dimerização entre duas moléculas de STAT3. Os dímeros assim ativados, se translocam para o núcleo celular e se ligam à sequência de seus genes-alvo para iniciar a transcrição. Essa transcrição envolve a produção de fatores de crescimento e moléculas anti-apoptóticas para iniciar o papel crucial de crescimento e sobrevivência celular (KISHIMOTO et al., 2021).

Dentre os processos celulares, a STAT3 desempenha atividades de proliferação celular, apoptose, angiogênese, resposta imune e metástase (BANERJEE; RESAT, 2016). Segundo

Catunda et al. (2019), durante o desenvolvimento da fase aguda da laminite de origem séptica, a apoptose lamelar parece não apresentar papel importante na falha lamelar em cavalos com laminite induzida por sepse.

Essa sinalização demonstra realizar uma transformação das células epiteliais por um evento chamado de transição mesenquimal, em doenças inflamatórias crônicas, como doenças inflamatórias do trato gastrointestinal. Na laminite, a característica observada é a desregulação epitelial do citoesqueleto que leva à perda de conectividade das junções lamelares e consequente falha lamelar (DERN et al., 2020).

Segundo Leise (2012), vários genes induzidos pela proteína STAT podem atuar fazendo um feedback negativo, causando a inibição do complexo de sinalização JAK/STAT. O supressor de sinalização de citocina (SOCS) regula negativamente a ativação da IL-6 sobre o receptor gp130-STAT3, em resposta dos queratinócitos. Isso previne que o sistema imune promova o acúmulo excessivo de neutrófilos e a produção de quimiocinas.

A regulação positiva também pode ocorrer através da ativação do gene Rac 1 e produção de pré RNAm para a produção de transcritos de Rac 1 pelo processo de splicing. Assim, inicia-se uma série de redes de sinalização, incluindo complexo regulatório de remodelação do citoesqueleto de actina, ativação de proteínas quinases (PAKs, MAPKs) e fatores de transcrição (NFκB, Wnt/β-catenina, STAT3) (KOTELEVEST; CHASTRE, 2020).

8.1 Evidência da ativação da via jak/stat3 no tecido lamelar de equinos

Assim como na via de sinalização da mTOR, as alterações lamelares evidenciadas durante a fase prodrômica da laminite podem ser atribuídas a via de sinalização JAK/STAT3. Acredita-se que uma grave resposta inflamatória, que ocorre devido a produtos bacterianos circulantes na corrente sanguínea, estimulam o sistema imune a produzir citocinas da família IL-6 (FALEIROS et al. 2011a; LEISE, 2018). Tal processo pode promover o recrutamento de receptores de membrana glicoproteínas-130 (gp-130), tornando-os ativos na sinalização da laminite relacionada à sepse (DERN et al., 2020). Estudos mostram que a STAT3 fosforilada está envolvida na transição mesenquimal em diversos processos patológicos tanto em humanos quanto em ratos (GAO et al., 2022; XIONG et al., 2012). Assim, a IL-6 possui um papel importante proporcionando a ativação de STAT3 na alteração fenotípica (MIAO et al., 2014).

Uma das principais alterações fenotípicas observadas em equinos submetidos a modelos de indução de laminite por Laskoski et al. (2010), foi a mudança na forma do núcleo celular de

ovalado a esférico. Outras características observadas foram, o alongamento e afilamento das lamelas primárias e secundárias, além do contorno irregular da membrana basal. Cota (2021), observou alteração fenotípica no tempo 12h após a indução por oligofrutose. A maioria dos núcleos das células epitélio basais lamelares apresentavam-se arredondados e as lamelas primárias e secundárias alongadas.

A ativação exacerbada dos receptores de citocinas desencadeia a cascata de fosforilação de tirosinas com o recrutamento de Janus Kinase para o sítio de ligação com a gp-130, na membrana celular (QIN et al., 2019). Uma vez que se inicia essa sinalização de IL-6, obrigatoriamente ocorre a produção de moléculas STAT3. A interação dessas duas moléculas apresenta uma forte correlação, visto em modelos de indução de laminite por sobrecarga de carboidratos e extrato de noqueira preta (LEISE et al., 2012).

Segundo Leise et al. (2012), no modelo de laminite por extrato de noqueira preta observou-se o aumento na produção e fosforilação da proteína STAT3, na fase de desenvolvimento da laminite (3 horas após a indução), que coincide com a leucopenia. Já no modelo de sobrecarga de carboidratos, o aumento da STAT3 ocorreu no período de desenvolvimento, que coincidia com a febre (12-22 horas após a indução), exacerbando no início da claudicação (ao atingir grau de Obel 1).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A laminite em equinos é uma afecção desafiadora, no amplo contexto em que ela se encontra, e o conhecimento da fisiopatologia é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficientes. Assim, a sinalização inflamatória parece desencadear uma complexa sinalização intracelular das vias da PI3K/Akt/mTOR/RPS6 e JAK/STAT3, na transição mesenquimal e mudança do fenótipo celular, no tecido lamelar do casco de equinos com laminite. Esses mecanismos de sinalização intracelular são bem preservados em várias doenças como o câncer, diabetes e psoríase em humanos, e recentemente, associado a laminite.

CAPÍTULO 2: FOSFORILAÇÃO DE RPS6 VIA COMPLEXOS mTORC1 e mTORC2 NO TECIDO LAMELAR DE EQUINOS SUBMETIDOS A LAMINITE POR OLIGOFRUTOSE

RESUMO

Evidências recentes indicam o envolvimento de proteínas da via de sinalização intracelular mTOR/RPS6 em mudanças fenotípicas em células epidermais das lamelas do casco de equinos durante o desenvolvimento da laminite. Com o objetivo de expandir esse conhecimento, avaliou-se a expressão imunohistoquímica das proteínas Raptor, Rictor e RPS6 fosforilada (p-RPS6, serinas 235/236 e 240/244) em 53 amostras lamelares conservadas em blocos de parafina, obtidas de 18 equinos submetidos a modelo de laminite séptica por oligofruose, em experimentos prévios, em grupos controle (CON), em fase de desenvolvimento (ETP) e em fases iniciais (OG1) e evoluídas (OG3) da claudicação. Imagens obtidas por escaneamento robótico foram capturadas e analisadas pelo software imageJ para contagem de células p-RPS6 positivas e determinação da área marcada para os anticorpos Rictor e Raptor em 9 campos aleatórios divididos na derme lamelar, epiderme axial e epiderme abaxial (magnificação 10x). No tecido lamelar, também foi determinada a distribuição percentual da expressão dessas proteínas entre a derme e a epiderme por meio da análise de cinco campos aleatórios em magnificação superior (40x e 80x). Em todos os grupos observou-se intensa, porém muito distinta, expressão de Rictor e Raptor. Enquanto a primeira ocorreu quase exclusivamente na derme e segunda já se expressou praticamente só na epiderme. Já a expressão de p-RPS6 foi dispersa em todas as camadas, ocorrendo de forma discreta em CON e ETP e intensa em OG1 e OG3. Na análise de p-RPS6 as amostras do grupo CON e ETP apresentaram média geral (intervalo) de 3,7 (0-21) ser235/236 e 57,5 (1-260) ser240/244 células p-RPS6+/mm². Na região sublamelar, o número de células positivas para p-RPS6 S235/236 e S240/244 atingiu o pico durante OG1 com aumentos de 75,1 (P=0,0004) e 16,7 (P=0,003), respectivamente. Nas lamelas axiais, o pico de expressão de p-RPS6 ocorreu em OG3 com 36,6 (S235/236; P=0,0005) e 16,7 (S240/244; P=0,003). A expressão de Rictor se manteve constante em todos os tempos e regiões estudadas. Já em Raptor, detectou-se maior expressão na derme sublamelar (P=0,0324) e nas lamelas axial (P=0,019) e abaxial (P=0,0065) em OG1 comparado ao CON. Na lamela axial, também houve redução de OG3 em relação aos grupos OG1 (P<0,0001) e ETP (P=0,004) e, na lamelar abaxial, a média do grupo OG3 se manteve reduzido em relação aos grupos ETP (0,0179) e OG1 (P<0,0001). Tais achados comprovam a intensa fosforilação de RPS6 não só na epiderme como na derme lamelar e sublamelar de equinos com laminite séptica e demonstram, de forma inédita, as distintas prevalências da via mTORC1 (sensível à rapamicina) na derme e da via mTORC2 (não diretamente inibida pela rapamicina) na epiderme no tecido lamelar de equinos.

Palavras-chave: via de sinalização, mTOR, alteração fenotípica, RPS6

CHAPTER 2: PHOSPHORYLATION OF RPS6 BY mTORC1 AND mTORC2 PATHWAYS IN THE LAMELLAR TISSUE OF HORSES SUBJECTED TO THE OLIGOFRACTOSE LAMINITIS MODEL

ABSTRACT

Recent evidence indicates the involvement of proteins from the intracellular signaling pathway mTOR/RPS6 in phenotypic changes in epidermal cells of equine hoof lamellae during the development of laminitis. To expand on this knowledge, the immunohistochemical expression of the proteins Rictor, Raptor, and phosphorylated RPS6 (p-RPS6 serine 235/236 and 240/244) was evaluated in 53 lamellar samples preserved in blocks, obtained from 18 horses subjected to a septic laminitis model induced by oligofructose in previous experiments, as well a control (CON) groups, a development phase (ETP), and early (OG1) and advanced (OG3) stages of lameness. Images obtained through robotic scanning were captured and analyzed by ImageJ software to count positive p-RPS6 cells and determine the area marked for Rictor and Raptor antibodies in 9 random fields divided into the lamellar tissue, axial epidermis, and abaxial epidermis (magnification 10x). In the tissue, the percentage distribution of the expression of these proteins between the dermis and the epidermis was also determined through the analysis of five random fields at higher magnification (40x and 80x). In all groups, intense but distinct expression of Rictor and Raptor was observed, with the former occurring almost exclusively in the dermis and the latter almost solely in the epidermis. The expression of p-RPS6 was dispersed in all layers, occurring discreetly in CON and ETP and intensely in OG1 and OG3. In the p-RPS6 analysis, the CON and ETP groups showed a general mean (range) of 3.7 (0-21) ser235/236 and 57.5 (1-260) ser240/244 p-RPS6+ cells/mm². In the sublamellar region, the number of positive cells for p-RPS6 ser235/236 and ser240/244 peak during OG1 with increases of 75.1 (P=0.0004) and 16.7 (P=0.003), respectively. In the peak expression of p-RPS6 occurred in OG3 with 36.6 (ser235/236; P=0.0005) and 16.7 (ser240/244; P=0.003). The expression of Rictor remained constant in all times and regions studied. On the other hand, in Raptor, higher expression was detected in sublamellar dermis (P=0.0324) and axial (P=0.019) and abaxial (P=0.0065) lamellae in OG1 compared to CON. In the axial lamellae, there was also a reduction in OG3 compared to OG1 (P<0.0001) and ETP (P=0.004), and in the abaxial lamellar, the mean of the OG3 group remained reduced compared to the ETP (0.0179) and OG1 (P<0.0001) groups. These findings confirm the intense phosphorylation of RPS6 not only in the epidermis but also in the dermis lamellar and sublamellar tissue of horses with septic laminitis, and demonstrate, for the first time, the distinct prevalence of the mTORC1 pathway (sensitive to rapamycin) in the dermis and the Mtorc2 pathway (not directly inhibited by rapamycin) in the epidermis of the equine lamellar tissue.

Keywords: signaling pathway, mTOR, phenotypic change, RPS6

1. INTRODUÇÃO

Os conhecimentos sobre o Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) tiveram início nos anos 1970, com a descoberta da rapamicina, um composto isolado da espécie *Streptomyces hygroscopicus* na ilha de Rapa Nui, mais conhecida com Ilha de Páscoa (JOHNSON et al., 2013).

Estudos foram conduzidos para identificar os genes alvos da rapamicina, como mediadores genéticos dos efeitos inibitórios do crescimento da rapamicina e, logo depois, a proteína mTOR foi purificada de células de mamíferos, demonstrando ser o alvo da rapamicina (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Desde o seu surgimento, a rapamicina foi amplamente estudada como um agente antifúngico, mas logo descobriram-se suas propriedades imunossupressoras, derivando vários compostos e, em 1999, passou a ser aprovada para o uso em cirurgias de transplantes em humanos. Outras pesquisas foram conduzidas e o composto passou a ser utilizado para diversas outras doenças, inclusive para o câncer, pois foi observado atividade antiproliferativa (JOHNSON et al., 2013).

Desde então, a mTOR tem sido caracterizada como um componente chave para a regulação dos comportamentos básicos celulares essenciais em processos anabólicos e catabólicos que permitem a sobrevivência celular, mesmo em condições em que a disponibilidade de nutrientes possa ser variável (STANFEL et al., 2009). Vários autores acreditam que esta proteína funciona como um regulador mestre do crescimento e metabolismo celular em resposta a estímulos nutricionais e hormonais, agindo por duas principais vias, a do complexo mTOR 1 (mTORC1), que é muito sensível à ação inibidora da rapamicina, e a do complexo mTOR 2 (mTORC2), que não é inibida diretamente por este fármaco (LAPLANTE, 2012).

Na espécie equina, poucos trabalhos a respeito da mTOR têm sido publicados até então, sendo a maioria deles relacionados ao anabolismo muscular. Entretanto, grande destaque tem sido dado à ativação da via mTOR, indicada pela marcada expressão da fosforilação de uma das proteínas terminais dessa cascata, a proteína ribossomal S6 (RPS6), durante o desenvolvimento da laminite equina. Isso, sobretudo, pelo fato dessa via ser comum às principais formas de laminite, ou seja, a endocrinopática, a de sobrecarga de peso e a inflamatória, apontando aí um possível alvo terapêutico eficiente na prevenção e cura de todas as formas dessa grave afecção (LANE et al., 2017; DERN et al., 2020).

Com o intuito de expandir o conhecimento sobre a relevância da ação da mTOR na laminite equina, o objetivo do presente trabalho é avaliar a expressão imunohistoquímica da RPS6

fosforilada (p-RPS6) e das proteínas Raptor (componente de mTORC1) e Rictor (componente de mTORC2) em amostras de tecido lamelar de equinos submetidos à laminite inflamatória pelo modelo de sobrecarga gastrointestinal de oligofrutose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aquisição das amostras

Foram utilizadas 53 amostras lamelares arquivadas de casco de 18 equinos, submetidos ao modelo de laminite séptica por oligofrutose, conservadas em blocos de parafina. A metodologia experimental foi aprovada pelo Comitê de Ética Sobre Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais CETEA/UFMG protocolo no 281/2013.

As amostras de estrato lamelar foram coletadas através de biópsia, de acordo com descrição prévia (SPADETO, 2017). Resumidamente, laminite foi induzida por administração de oligofrutose (Raftilose P95 – Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda), via sonda nasogástrica, na dose de 10g/Kg, diluído em 3 litros de água, após período de sensibilização na dose de 1g/Kg s.i.d., durante três dias. Cada amostra foi coletada de cada casco usando técnica de biópsia com o lamelótomo de Falcão-Faleiros (Ribeiro et al. nos tempos no T0 (CON, 17 amostras) basal e nos tempos T12 (ETP, 11 amostras), T36 (OG1, 18 amostras) e T60-73 (OG3, 7 amostras) horas pós-indução de laminite, seguindo a sequência de membro pélvico esquerdo (T0 - controle), pélvico direito (T12), membro torácico direito (T36) e torácico esquerdo (T60-73).

2.2. Imunohistoquímica

Do material histológico arquivado deste experimento, foram recuperadas, em perfeito estado de conservação, 17 amostras do CON, 11 do ETP, 18 do OG1 e 7 do OG3. Esse material foi enviado para os laboratórios do Equine Health Studies Program na Louisiana State University, em colaboração com a Profa. Britta S. Leise, onde as amostras lamelares previamente fixadas em formol e embebidas em parafina foram seccionadas a 5 μ e montadas em lâminas de vidro. Para o processo de desparafinização, as lâminas foram aquecidas para derretimento da parafina e imersas por 3 minutos em xilol (3x), para subsequentes imersões (2x por 4 minutos) em etanol a 100%, a 95% e em água deionizada.


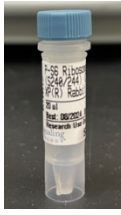


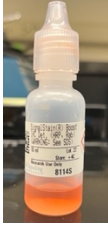
Para recuperação antigênica, as amostras foram imersas em um recipiente contendo tampão de citrato (90mL H₂O_d + 10mL de citrato) e colocados em banho maria na temperatura de 93°C, por 10 minutos, seguidas por repouso em temperatura ambiente por mais 10 minutos.

O bloqueio de peroxidase foi realizado por imersão em uma solução contendo 10mL de H₂O₂ e 90 mL de metanol por 10 minutos, com posterior lavagem com H₂O_d (2x) por 4 minutos e tampão TBST (Salina tamponada TRIS com Tween 20). Já o bloqueio antigénico inespecífico foi realizado por aplicação imersão da amostra em solução de leite em pó desnatado (1%) em TBST por uma hora. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de TBST por 4 minutos (2x).

A exposição ao anticorpo primário ocorreu em câmara úmida à uma temperatura média de 3,3°C por 12 horas. a aplicação de anticorpo primário Rabbit da *Cell Signaling Technology* p-RPS6 ser 235/236 (diluição de 1:200). Após essa etapa, as lâminas foram imersas em TBST (2x) por 4 minutos e, em seguida, expostas ao anticorpo secundário (Signalstain Boost HRP, Rab) na diluição de 1:100, por 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. O mesmo protocolo foi realizado para a imunistoquímica das amostras que estavam sendo testadas os anticorpos Rabbit Rictor e Raptor, os quais foram feitas diluições de 1:200 e aplicação de 20 µl sobre as lâminas, e p-RPS6 ser240/244 (diluições de 1:400) (Quadro 2).

O protocolo seguiu com a etapa de detecção usando o (diaminobenzidina associada ao peróxido de hidrogênio (ImmPACT® DAB). Nessa etapa, foi preparado a reação de peroxidase com o ImmPACT® DAB Substrate Kit, Peroxidase (HRP) – (SK-4105), da Vector Laboratories, com uma gota do ImmPACT DAB Reagent 1 em 1mL do ImmPACT DAB Diluent, em um ependorf escuro (Marrom). Em cada lâmina foi aplicado 50µl e deixado por 2 minutos. Em seguida, lavagens foram realizadas com H₂O_d (2x) por 4 minutos para receberem a contra coloração de hematoxilina, seguidas de novas lavagens com H₂O_d (3x) por 3 minutos e desidratação com álcool 95% (2x 20 segundos), álcool 100% (2x 20 segundos) e xilol (2x 20 segundos). A etapa foi finalizada com a aplicação de uma gota de resina (Vecta mount®) e aplicação da lamínula sobre o tecido.

Quadro 2 - Anticorpos utilizados para imunistoquímica de p-RPS6 (ser235/236; ser240/244), Rictor, Raptor e o anticorpo secundário.

Anticorpos	Imagem
anticorpo primário Rabbit da <i>Cell Signaling Technology</i> p-RPS6 ser 235/236 Diluição 1:200	
anticorpo primário Rabbit da <i>Cell Signaling Technology</i> p-RPS6 ser 240/244 Diluição 1:400	
Raptor (24C12) Rabbit mAb 2280 <i>Cell Signaling Technology</i> Diluição 1:200	
Rictor (53A2) Rabbit mAb 2114 <i>Cell Signaling Technology</i> Diluição 1:200	
anticorpo secundário (Signalstain Boost HRP, Rab) Diluição 1:100	

2.3. Análise das imagens

Após montadas, as lâminas foram submetidas a escaneamento robótico com o NanoZoomer Digital Pathology System e enviadas para um computador com o software NDP.view para visualização e captura de imagens.

Inicialmente, foram realizadas capturas aleatórias de telas em nove campos, com o aumento de 10x, sendo 3 abordando a região sublamelar, 3 na região axial e 3 na região abaxial das lamelas (Fig. 21). Para lâminas coradas para p-RPS6 (ser235/236) e (ser240/244), também foram realizadas 10 capturas aleatórias de tela por lâmina digitalizada, sendo 5 no aumento 40x para a região axial e 5 no aumento de 80x para a região abaxial, sempre buscando imagens com 50% da tela ocupada por epiderme e os outros 50% por derme lamelar (Fig. 22A-B).

Nas lâminas processadas para Rictor e Raptor (Fig. 22C-D e Fig. 22E-F, respectivamente), também foram realizadas cinco capturas aleatórias com área de $25\mu\text{m}^2$ (aumento de 80x) exclusivamente no extrato lamelar para obtenção do diferencial de expressão entre camadas dermal e epidermal.



Figura 21 - Microfotografia do processo de contagem de células em amostras lamelares. Três campos ($1,67\text{ mm}^2$) obtidos das camadas sublamelar e lamelares axial e abaxial.

Em seguida, as capturas foram processadas através do computador pessoal portátil, utilizando o software Imagem J. Nesse programa era realizado uma calibragem de acordo com a proteína a ser pesquisada e realizado a contagem de células coradas, identificadas com a coloração vermelha sobre a marcação marrom de DAB na lâmina. O resultado era obtido automaticamente e em seguida tabulado em planilha de Excel (Fig. 23 e 24).

Para a contagem de células positivas para p-RPS6, acionou-se o comando Color Threshold e o espectro de cor (Hue) foi limitado entre valores de 0 e 71. Adotou-se saturação entre 0 e 255 e brilho entre 0 e 185. A partícula foi contada apenas se maior que 31 pixels (Fig. 23).

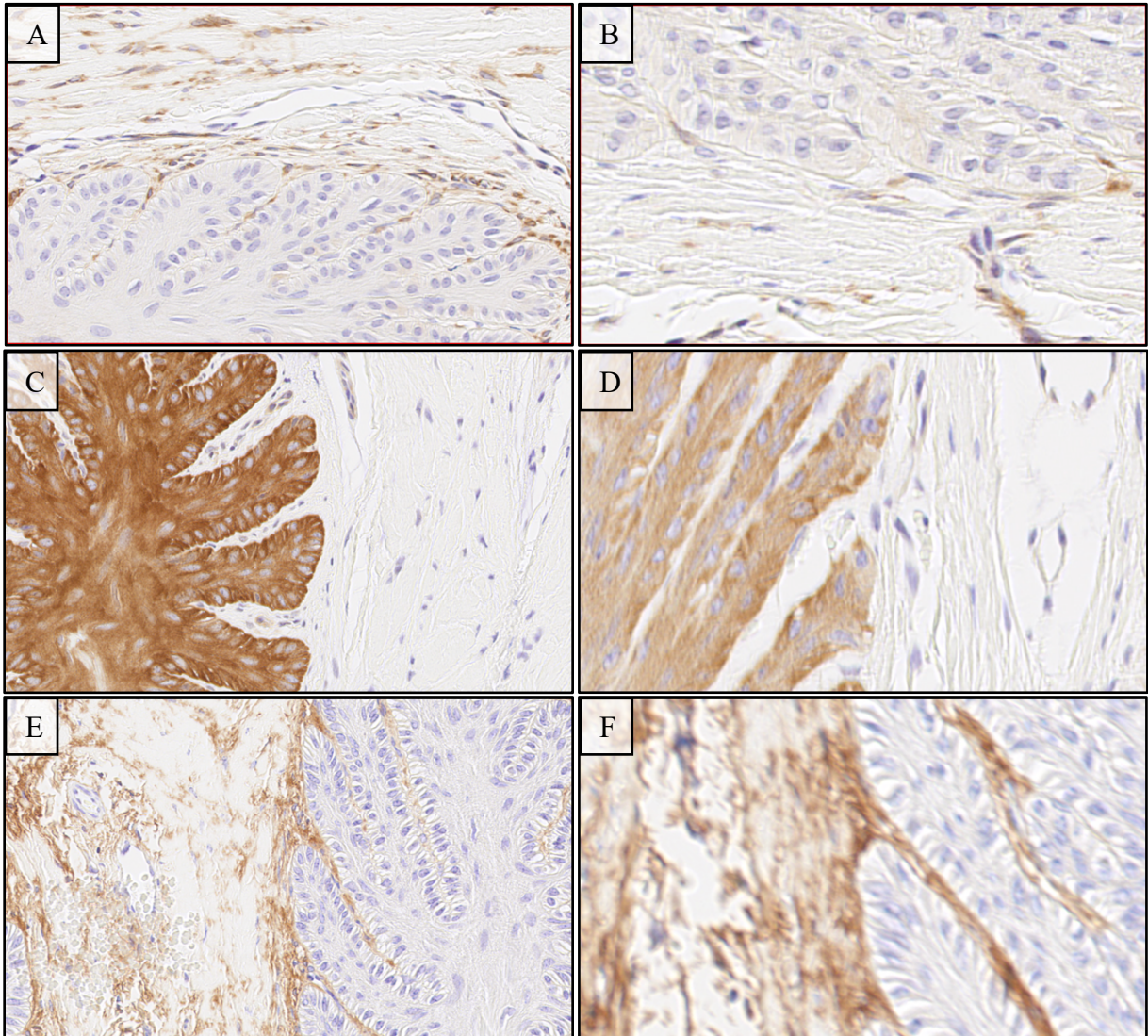


Figura 22 - Microfotografia lamelar de casco de equino submetido a o modelo de indução de laminite por oligofrutose. As imagens A e B correspondem a região axial e abaxial da lamela epidermal no aumento de 40x e 80x, respectivamente, para o anticorpo p-RPS6 240/244. C e D representa a região axial e abaxial da lamela epidérmica com aumento de 40x e 80x, respectivamente, para o anticorpo Rictor. E e F representa a região axial e abaxial da lamela epidérmica com aumento de 40x e 80x, respectivamente, para o anticorpo Raptor. Note que as imagens foram posicionadas de modo a ficar 50% de derme e 50% epiderme. Lâminas processadas por imunohistoquímica para imunolocalização das proteínas p-RPS6 240/244, Rictor e Raptor.

Na porcentagem de tecido corado para Rictor, estabeleceu-se espectro de cor (Hue) entre 0 e 48, saturação entre 0 e 120 e brilho entre 0 e 215 (Fig. 24). Essa calibragem foi adotada também para a porcentagem entre derme e epiderme no extrato lamelar (Fig. 25B).

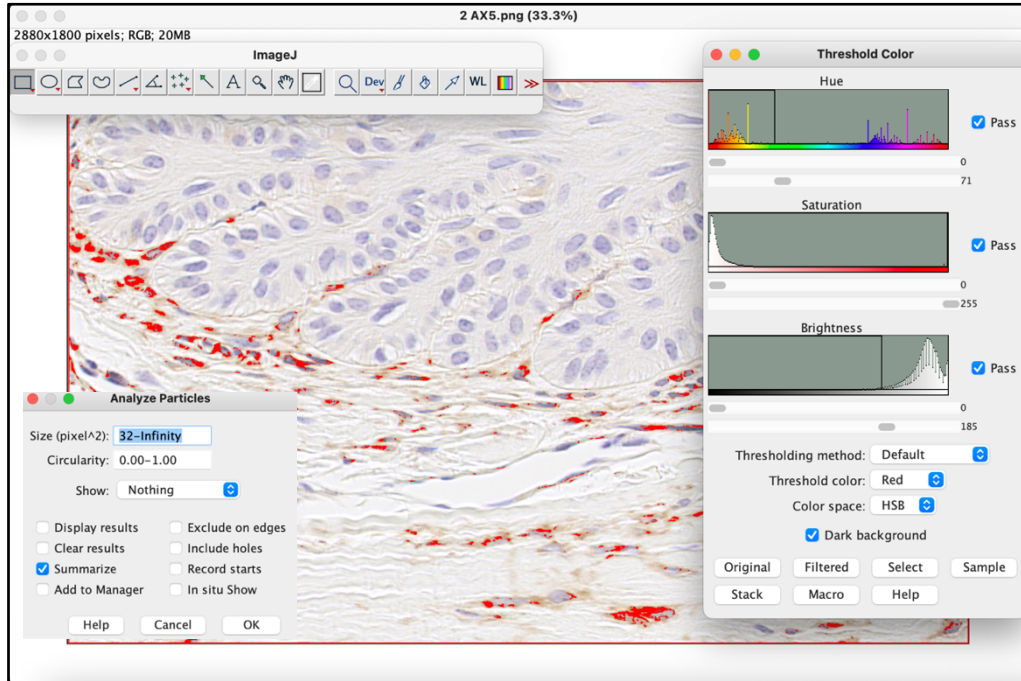


Figura 24 - Calibragem do software Imagem J para contagem de pixels com tamanho semelhante ao da célula para a p-RPS6. As imagens capturadas foram enviadas para o programa Image J® e usado a função Threshold Color para calibrar o espectro de cor (Hue) a saturação e a intensidade da marcação (Brightness) do DAB referente a p-RPS6 (ser235/236) e (ser240/244). Para análise das partículas o tamanho calibrado foi de 32 ao infinito.

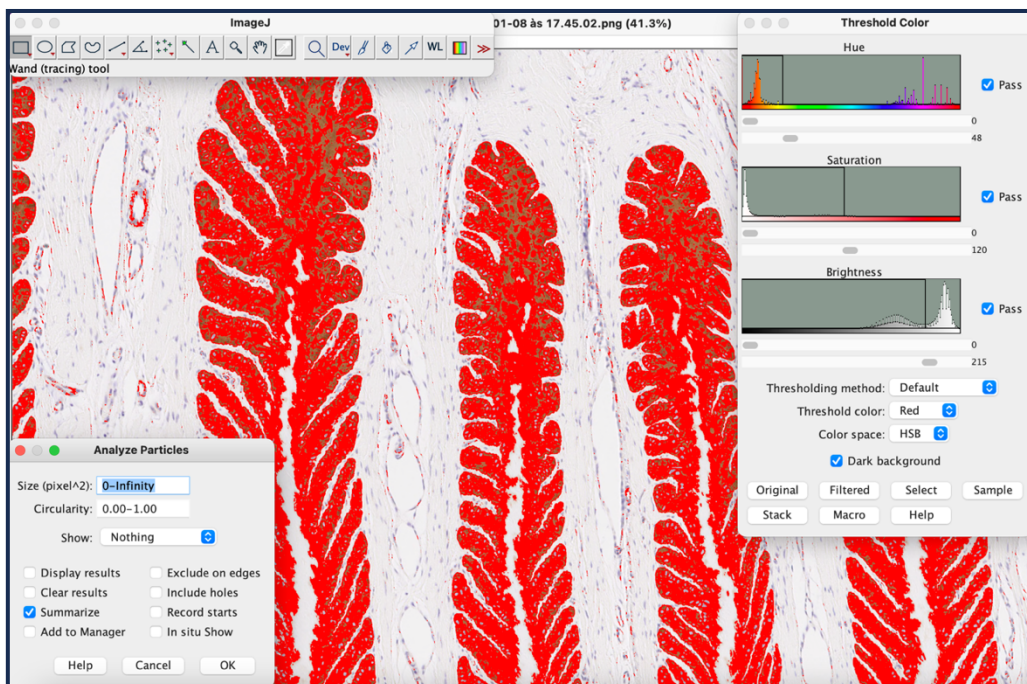


Figura 23 - Calibragem do software Imagem J para porcentagem de área total corada para a Rictor no aumento de 10x. As imagens capturadas foram enviadas para o programa Image J® e usado a função Threshold Color para calibrar o espectro de cor (Hue) a saturação e a intensidade da marcação (Brightness) do DAB referente ao Rictor.

Para a porcentagem de tecido corado para Raptor, estabeleceu-se espectro de cor (Hue) 0 e 50, saturação entre 16 e 255 e brilho entre 0 e 225 (Fig. 25). Essa calibragem foi adotada também para a porcentagem entre derme e epiderme no extrato lamelar (Fig. 25A).

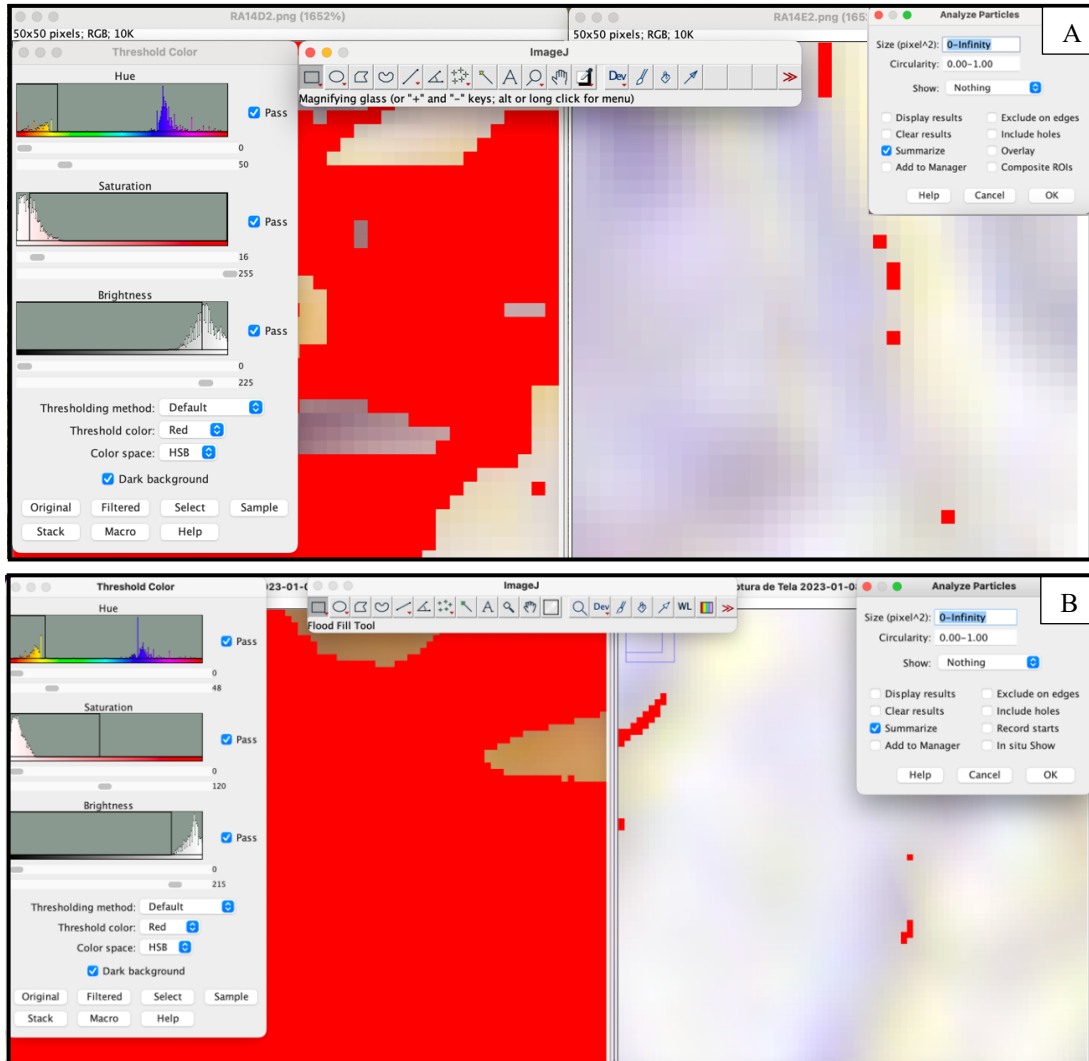


Figura 25 - Calibragem do software Imagem J para porcentagem de área total corada em área de $25\mu\text{m}^2$ para Raptor e Rictor no aumento de 80x. Na imagem superior, a calibragem representada nas lâminas de Raptor com a esquerda mostrando a área corada na derme lamelar e direita epiderme. Na imagem inferior, a calibragem representada nas lâminas de Rictor com a esquerda mostrando a área corada na epiderme e direita, a imagem demonstra a derme lamelar.

2.4. Análise estatística

Utilizou-se o software estatístico Prism 9 (Graphpad, EUA). Os dados foram analisados para distribuição normal pelos testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov e homoscedasticidade pelo teste de Bartlett. Em caso de variável com dados em distribuição normal e igualdade entre variâncias, utilizou-se ANOVA seguida do teste de Tukey para

comparação entre as médias. Para as outras variâncias, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. Para todos os testes considerou-se nível de significância de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Poucas células p-RPS6+ foram observadas nas amostras basais (CON) e ETP. Eles eram principalmente queratinócitos parabasais (Fig. 26A-B). No OG1 as marcações p-RPS6+ estavam localizadas principalmente em células vasculares e perivasculares ou em células com forma de fibroblastos, amplamente distribuídas na derme sublamelar e nas lamelas dérmicas (Fig. 26C). No OG3, além da marcação no tecido dermal, observou-se importante presença de marcação nas lamelas epidérmicas, principalmente nos queratinócitos basais, com predominância naqueles que também apresentavam sinais de alteração estrutural associada a descolamento da membrana basal (Fig. 26D).

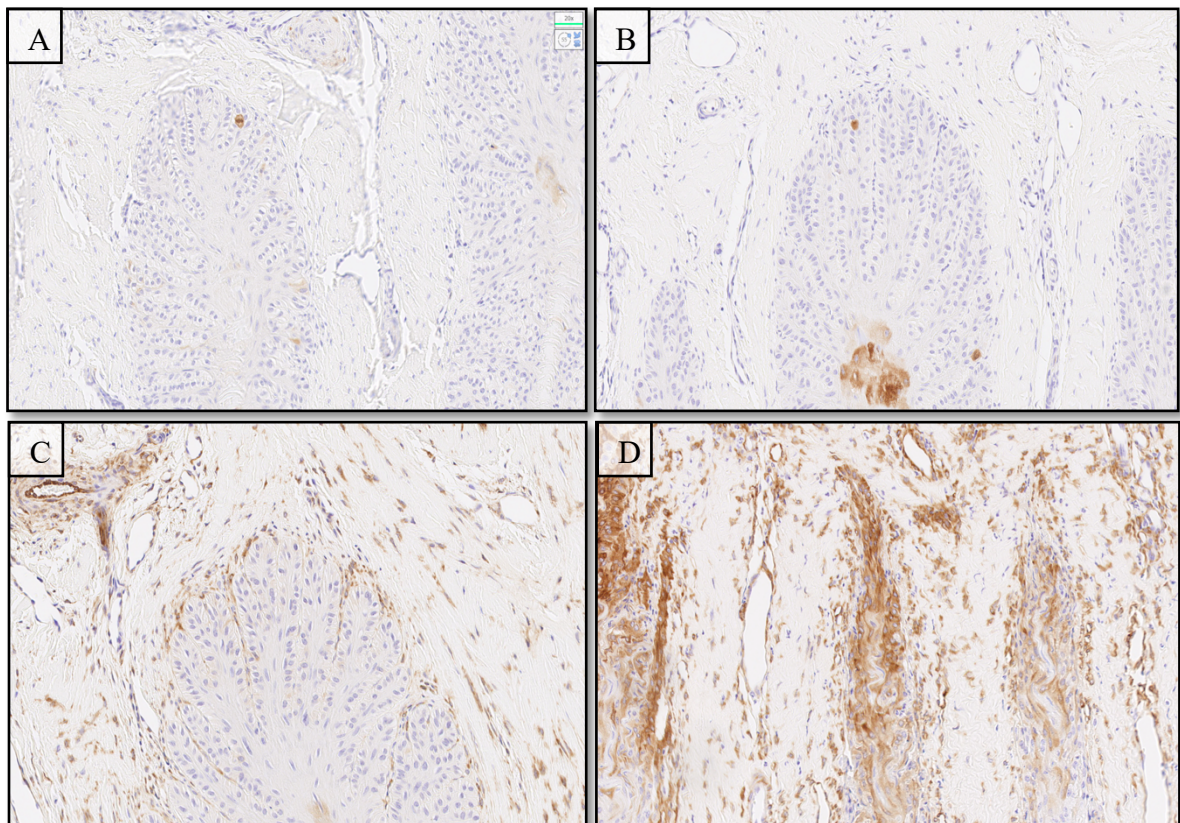


Figura 26 - Microfotografia demonstrando células positivas pRPS6+ (Ser 240/244) na região apical do tecido lamelar de 18 equinos com laminite induzida por oligofrutose. A representa o tempo basal (CON, n=17). Note que quase não foi observado marcação de células positivas. Isso foi observado na imagem B representando 12 horas após a indução da laminite (ETP, n=11); C 36h após a indução (OG1, n=18), a derme se encontra bastante corada; e na imagem D 60-73 horas (OG3, n=7), além da derme, a epiderme também se encontra corada, após a administração de oligofrutose.

Os dados relativos à distribuição percentual de células positivas para p-RPS6+ (Ser 240/244) na epiderme e derme das lamelas axial e abaxial estão representados na Figura 27.

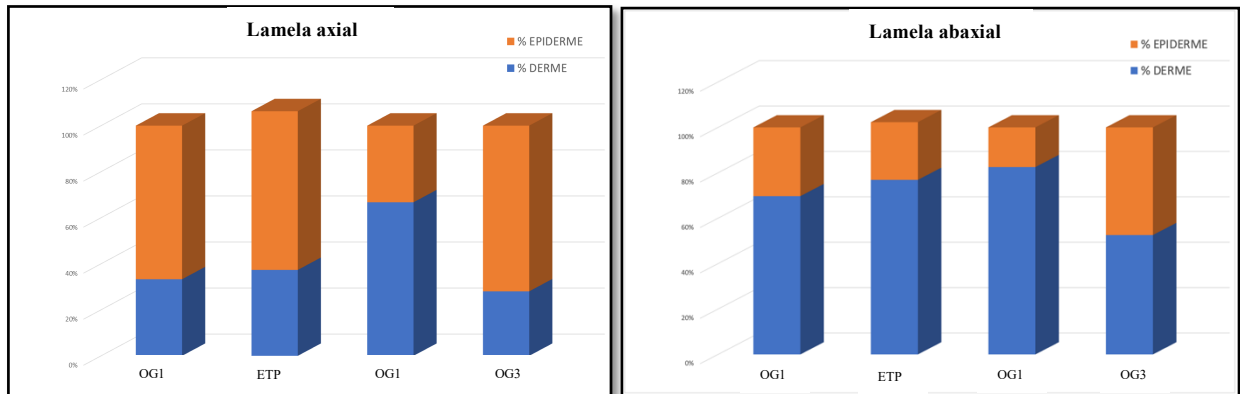


Figura 27 - Distribuição percentual de células p-RPS6+ (Ser 240/244) na epiderme e derme das lamelas axial e abaxial do estrato lamelar do casco em equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose antes (CON) e após 12 horas (ETP) de indução, no início da claudicação (LAM) e com claudicação avançada (OG3).

Os dados das contagens das células p-RPS6+ (Ser 235/236 e 240/244) estão representados na Figura 28. Na sublamela, a contagem de células atinge o pico em OG1 com valores 75,1 ($P=0,0004$) e 16,7 ($P=0,003$) vezes maiores em comparação com a contagem de células basais positivas para S235/236 e S240/244, respectivamente. Nas lamelas axiais, o pico ocorreu em OG3 com 36,6 ($P=0,0005$) e 16,7 ($P=0,003$), semelhante para S235/236 e S240/244.

Para as lamelas coradas para Rictor, componente responsável pela montagem e estabilidade estrutural e interação com substrato do mTORC2, foi possível observar que o tecido epidermal apresentou forte marcação e predominante em todos os tempos estudados. No tecido dermal, observou-se leve marcação, sempre evidente na parede de arteríolas (Fig. 29).

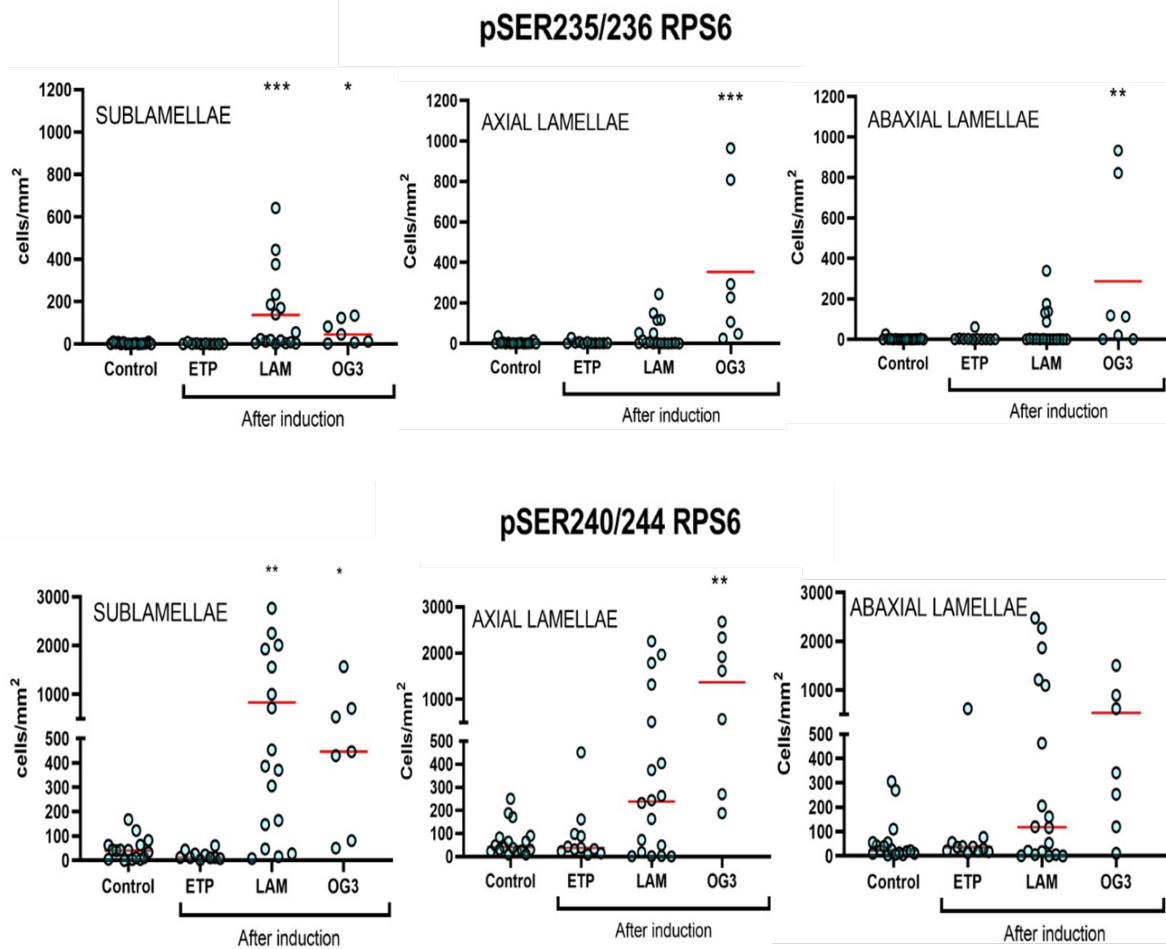


Figura 28 – Contagens de células imunomarcadas para RPS6 com fosforilação nas serinas 235/236 e 240/244 no estrato lamelar do casco em equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose antes (CON) e após 12 horas (ETP) de indução, no início da claudicação (LAM) e com claudicação avançada (OG3). Linhas vermelhas representam as médias.

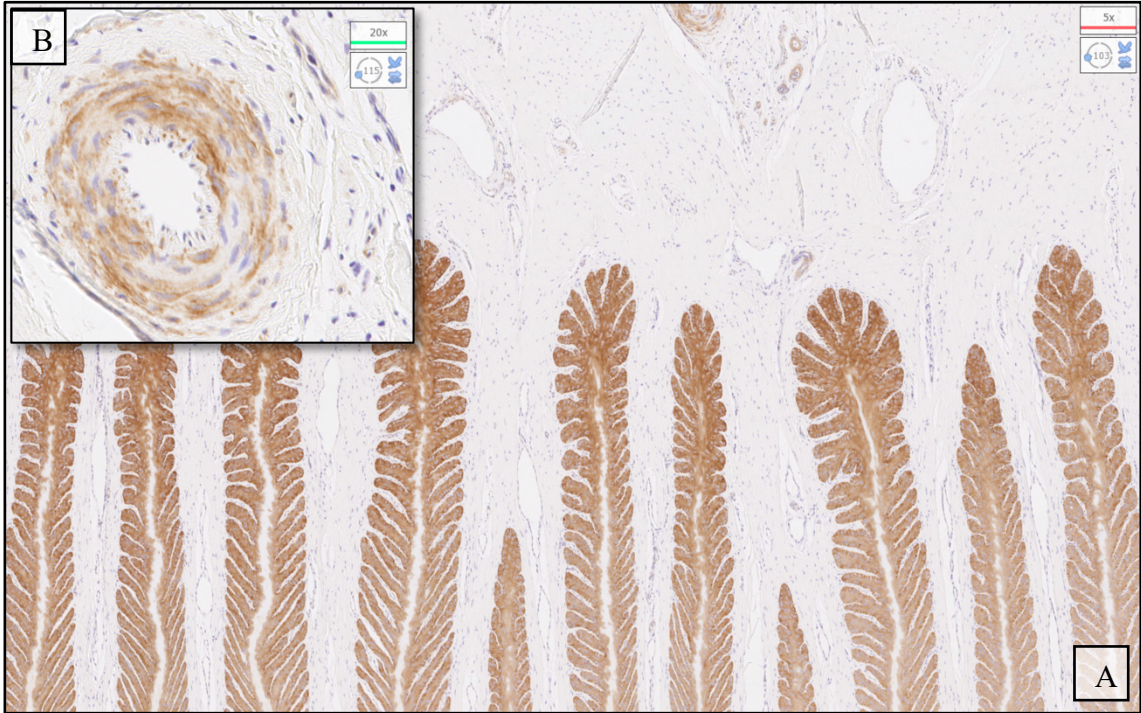


Figura 29 - Fotomicrografia de tecido lamelar equino submetido a imunolocalização para proteína RICTOR, com marcação intensa e predominante no tecido epidermico (A, 5x). No detalha B, observa-se em B marcação na parede das arteríolas presentes no tecido dermal.

Nas laminas coradas para Raptor, componente responsável pela montagem e estabilidade estrutural e recrutamento de substrato do mTORC1, foi possível observar marcação intensa e predominante no tecido dermal em todos os tempos estudados (Fig. 30).

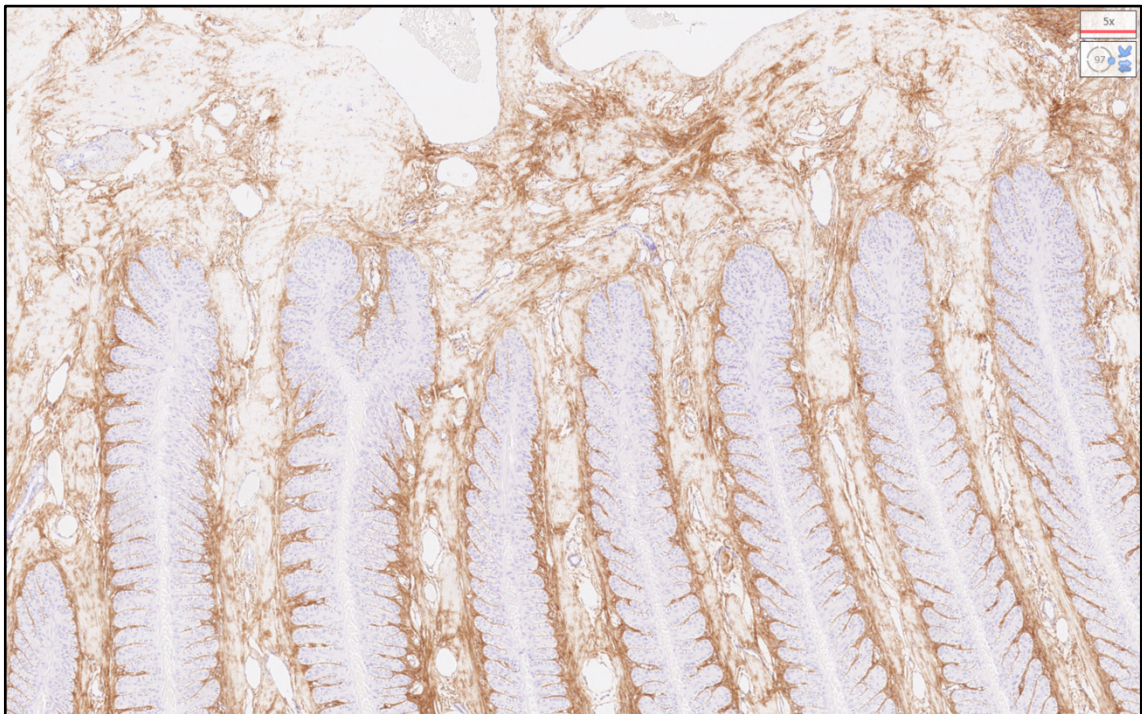
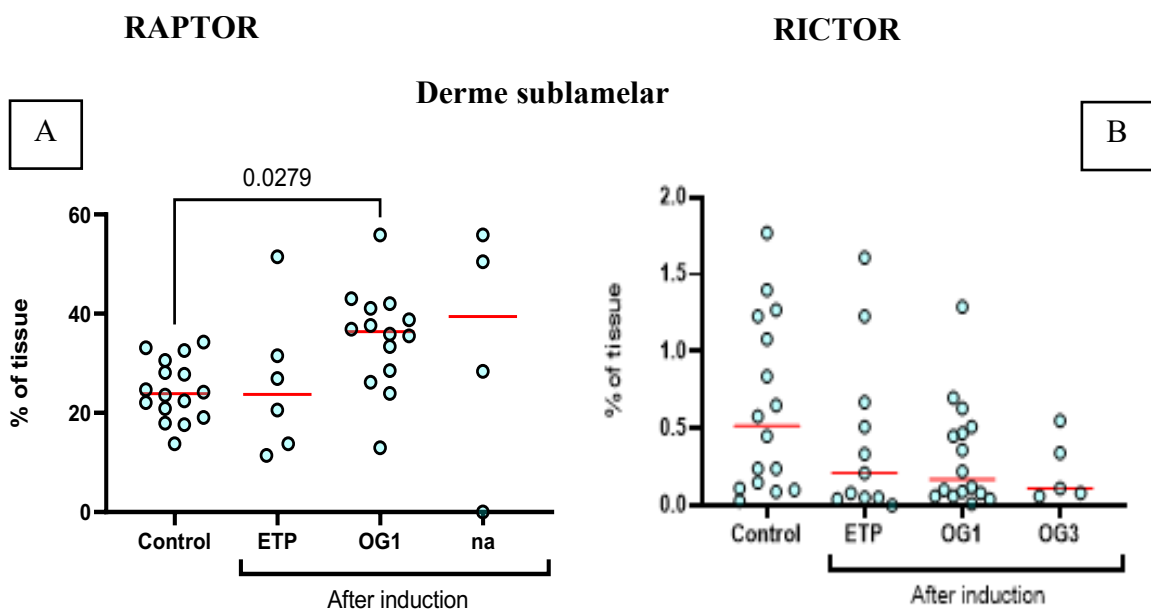


Figura 30 - Fotomicrografia com aumento de 5x demonstrando imunolocalização da proteína Raptor. Note que a coloração se apresenta apenas na região de derme, se concentrando especialmente próximo as lamelas.

Enquanto a expressão de Rictor se manteve constante em todos os tempos e regiões estudadas, o mesmo não aconteceu em relação a de Raptor. Nesse caso, houve aumento em todas as camadas comparando-se OG1 ao CON, com retorno a níveis inferiores já em OG3 na camada lamelar abaxial e mesmo inferior aos do CON na lamela axial ($P=0,004$).

Ao analisar a proteína Raptor, com a magnificação de 10x, foi possível evidenciar um aumento da média no grupo OG1 em relação ao CON ($P=0,0279$). Na lamela axial, foi observado um aumento na media de CON para OG1 ($P=0,0015$) com uma queda abrupta de OG1 para OG3 ($P<0,0001$), abaixo da contagem do grupo CON ($P=0.0038$). esses resultados foram sustentados na lamela abaxial (Controle x OG1 $P=0,0026$); (OG1 x OG3 $P=0,0003$) (Fig.31). Embora na sublamela ocorreu uma diminuição progressiva do grupo controle ao OG3, não houve alteração estatística nas médias. Na região de lamela axial e lamela abaxial as médias se mantiveram constantes (Fig 31).

Assim como no aumento de 10x, o aumento de 80x, com percentual de área no campo de 25mm^2 , foi possível observar que não houve alteração nas regiões de derme e epiderme lamelar para o Rictor. No entanto, na região de derme lamelar, para o Raptor observou-se um aumento de OG1 em relação aos grupos controle (0,0388) e ETP (0,0156), seguindo com uma queda abrupta de OG3 em relação ao OG1 ($<0,0001$) (Fig. 32).



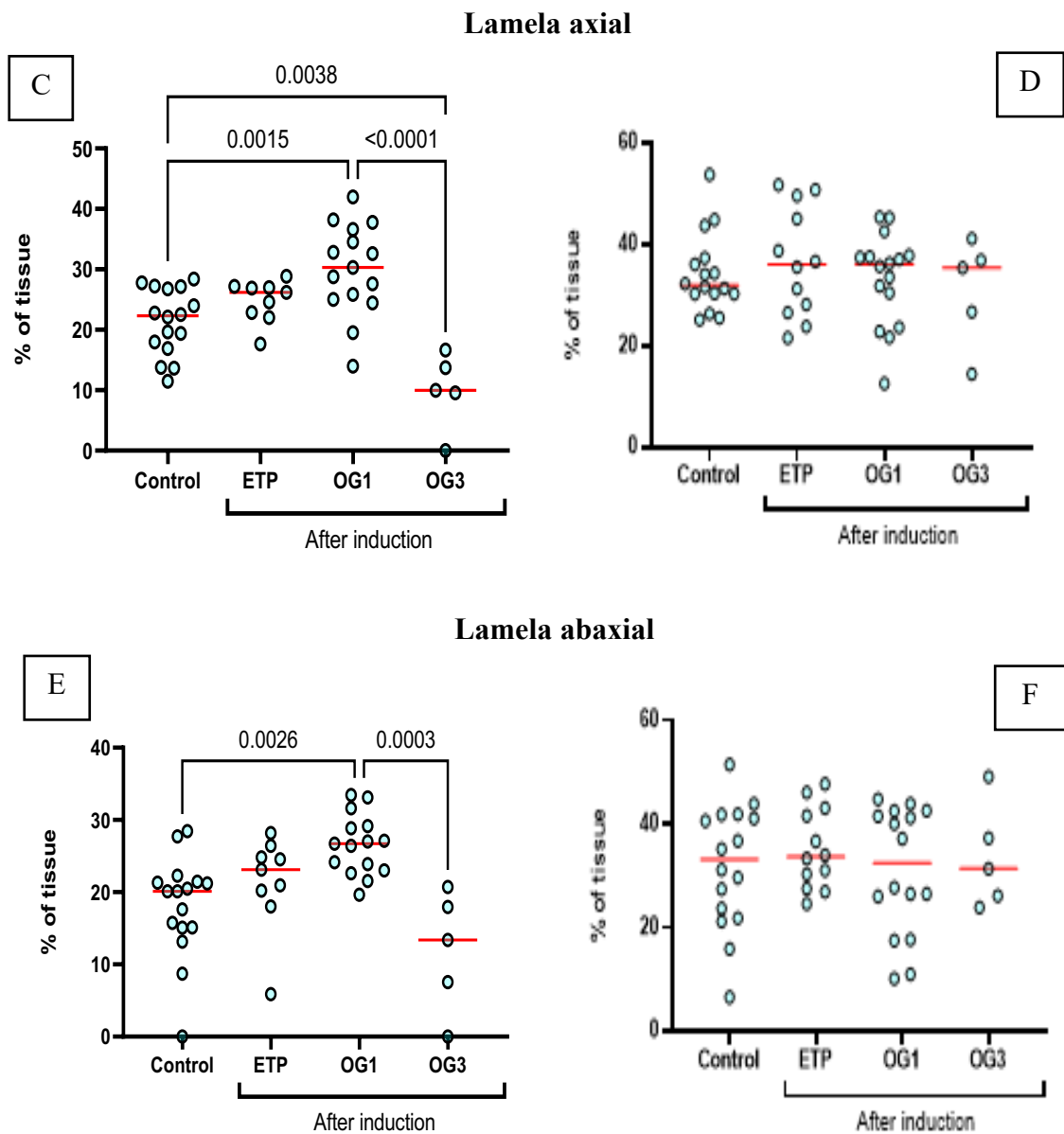


Figura 31 - Porcentagens de tecido imunomarcado para RAPTOR e RICTOR nas dermes sublamelares (A e B), lamelas axiais (C e D) e abaxiais (E e F). No estrato lamelar do casco em equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose antes (CON) e após 12 horas (ETP) de indução, no início da claudicação (LAM) e com claudicação avançada (OG3). Linhas vermelhas representam as médias.

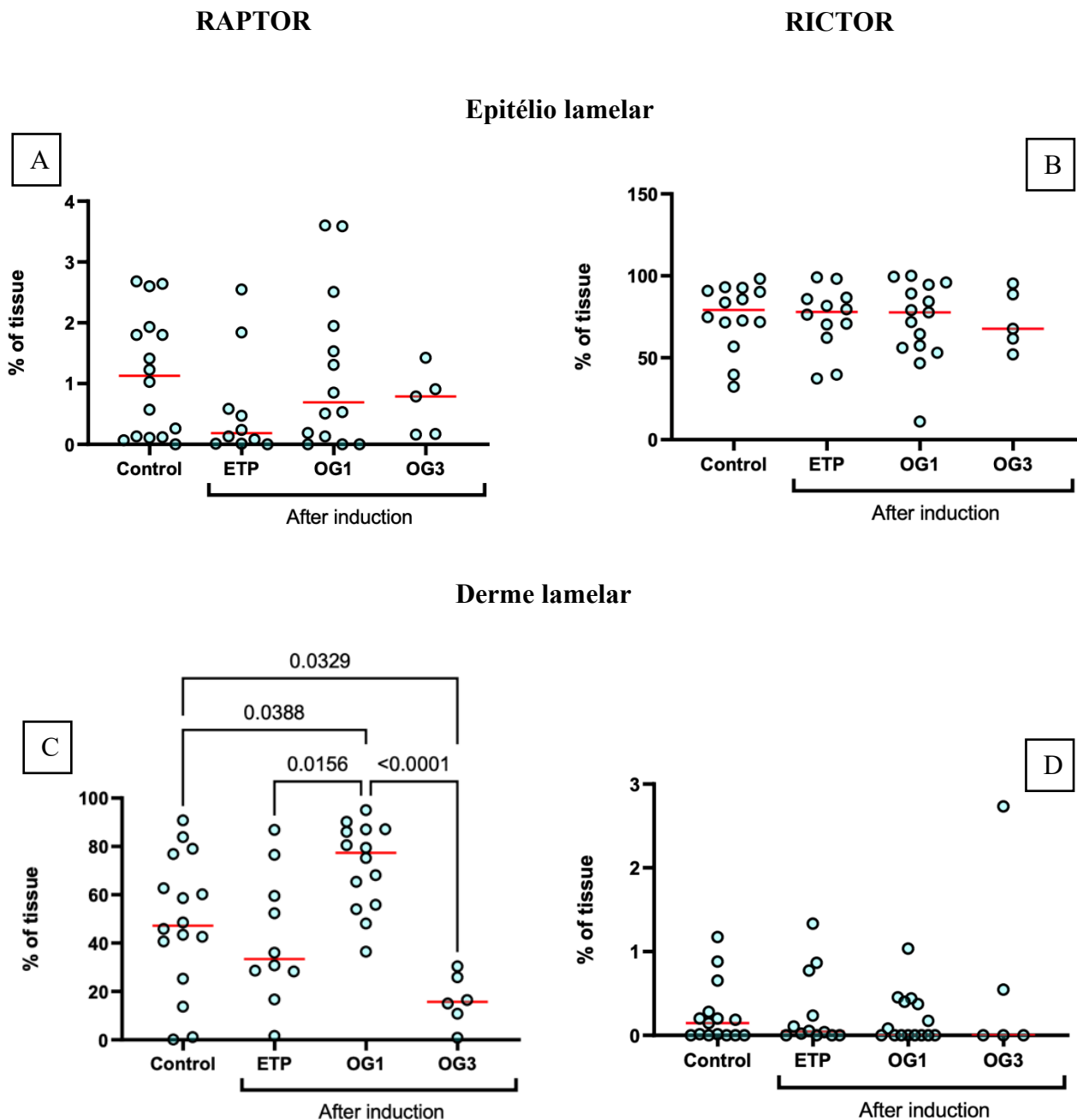


Figura 32 – Distribuição percentual da expressão lamelar de Rictor e Raptor entre derme e epiderme no estrato lamelar do casco em equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose antes (CON) e após 12 horas (ETP) de indução, no início da claudicação (LAM) e com claudicação avançada (OG3). Linhas vermelhas representam as médias. A e B representam as contagens Raptor e Rictor na região de epiderme lamelar enquanto C e D para derme

4. DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro no uso de técnicas convencionais de imunistoquímica em amostras teciduais fixadas por formol e embebidas em parafina para avaliar a dinâmica temporal da expressão da fosforilação de RPS6 em equinos com laminite. Os resultados confirmam evidências anteriores de relevante ativação da via mTOR, que se manifesta pela abundante

presença de p-RPS6 na fase aguda, durante a evolução de intensa inflamação local e consequente claudicação. Mais além, o estudo agrega achados inéditos revelando que a expressão de p-RPS6 de forma intensa não se limita à epiderme, conforme indícios preliminares (DERN et al., 2020), e que a principal distinção entre a derme e epiderme se refere à expressão das moléculas Rictor e Raptor. Devido à inequívoca prevalência da expressão de Rictor na epiderme e Raptora derme, tudo indica que, no tecido lamelar equino, a cascata de ativação mTOR se dá preferencialmente pelo complexo mTORC1 (diretamente sensível à rapamicina) na derme e pelo mTORC2 (não sensível diretamente à rapamicina) na epiderme.

Para o entendimento da relevância destes processos, se faz necessária alguma revisão conceitual. Durante o período embrionário, o folheto ectoderma dá origem à epiderme, que se desenvolve a partir de uma camada de células epiteliais achatadas. Essa diferenciação celular vai ocorrendo em torno do embrião, com subseqüentes divisões celulares simétricas, para aumentar a área de superfície, e divisões assimétricas, para dá profundidade ou espessura ao tecido (KOSTER; ROOP, 2007). Essa estratificação e diferenciação celulares são induzidas pela sinalização da mTOR (Ding et al., 2016). Apesar de ser ausente de pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas, o casco do equino é derivado da pele, sendo modificado para desempenhar função específica (FALEIROS; BELKNAP, 2017).

A sinalização dos complexos mTOR tem como produção final a proteína RPS6 pela subunidade ribossomal 40S. Essa proteína, após ser sintetizada, é fosforilada pela S6K1, uma enzima também produzida pelo mTORC1 (MOK et al., 2012). De todas as proteínas ribossômicas conhecidas, a única que sofre fosforilação induzida é a proteína ribossomal S6 (MEYUHAS, 2008). Como essa proteína possui os locais de fosforilação em serina (235/236) e serina (240/244), esse trabalho buscou evidenciar a produção dela em sua forma fosforilada, no modelo de indução de laminite por oligofrutose em equinos.

Para buscar compreender melhor as vias de sinalização intracelular que podem ocorrer na laminite de origem inflamatória, foram realizadas imunohistoquímica das proteínas Raptor (componente essencial para promover a estabilidade do complexo mTOR 1) e Rictor (componente essencial para promover a estabilidade do mTORC2) em sua forma não fosforilada, visto que, durante os períodos de privação de energia, os níveis de AMP aumentam, promovendo a ativação da enzima MAPK, que por sua vez, promove a fosforilação da proteína Rictor, inibindo de forma indireta a sinalização da mTOR (JOHNSON et al., 2013).

Sobre a expressão para RPS6, o anticorpo para serina 240/244 se mostrou mais eficiente que o para serina 235/236 para imunolocalização de células positivas, alcançando contagens médias

até 5 vezes superiores dentro dos mesmos grupos. Conforme observado na Fig. 11A-B, escassas células p-RPS6+ foram observadas nas amostras basais (CON) e após 12h de indução (ETP). Algumas marcações esparsas surgiram na parede de artérias sublamelares. Também se observaram queratinócitos, em grupos ou isolados nas lamelas epidermais, em um padrão que muito se assemelha ao encontrado em amostras controles de tecido lamelar marcado para a proteína inflamatória calprotectina (FALEIROS et al., 2009; FALEIROS et al., 2011a). Estudos em humanos e roedores indicam que a sinalização da mTOR é importante para que as células epidermais se mantenham engajadas no propósito de metabolismo ativo para a promoção de renovação tecidual (CIBRIAN et al., 2020). Assim, a sinalização da mTOR fisiologicamente está implicada na formação de barreira e reparo do tecido, atuando de forma temporal e regionalmente compartimentalizada na epiderme (DING et al., 2016).

No início da claudicação (LAM), células p-RPS6+ surgiram no endotélio, algumas com forma arredondada como se fossem leucócitos aderidos, na parede ou ao mesmo ao redor de vasos. Várias outras apresentavam formato característico de fibroblasto, e se encontravam amplamente distribuídas no tecido colagenoso da derme sublamelar e lamelas dérmicas primárias e secundárias. Na sublamela, a contagem de células atingiu o pico em OG1 com médias 75,1 (P=0,0004) e 16,7 (P=0,003) vezes maiores em comparação com a contagem de células basais positivas para S235/236 e S240/244, respectivamente. Baseado em estudos anteriores, esse desarranjo metabólico da via de sinalização intracelular coincide com importantes mudanças estruturais nos queratinócitos basais, que começam a se destacar da membrana basal (FALEIROS et al., 2011). A falange distal dentro da parede do casco dos equinos depende da integridade estrutural das junções lamelares. Em animais acometidos por laminite, essa integridade é rompida levando o destacando a derme da membrana basal, pela perda da sua aparência morfológica normal (LANE et al., 2017).

No experimento conduzido por Dern et al. (2020), utilizando o modelo de indução de laminite por oligofrutose, na análise por imunofluorescência, a presença da proteína RPS6 em sua forma fosforilada, foi descrita principalmente nas lamelas epidermais secundárias, com o tempo de 36h. A técnica utilizada no presente estudo ampliou este conhecimento ao imunolocalizar a versão fosforilada de RPS6, no mesmo tempo (36h), tomando toda a região de derme, mas concentrado entorno dos vasos e margeando o ápice das lamelas epidérmicas.

No grupo OG3 (60-73h) as marcações de p-RPS6+, além de estarem presentes no tecido dermal, passaram a abordar o tecido epidermal. Nas lamelas axiais, o pico ocorreu em OG3 com 36,6 (P=0,0005) e 16,7 (P=0,003), semelhante para S235/236 e S240/244. Embora não tenha sido

realizado análise descritiva em coloração de HE e PAS, foi possível observar diversas alterações fenotípicas das lamelas epidérmicas. O que reforça mais ainda o envolvimento dessa proteína com a mudança morfológica (LANE et al., 2017).

Nas lâminas marcadas para Rictor, componente indispensável para que ocorra a montagem e estabilidade estrutural e interação com substrato do mTORC2, observou-se forte marcação nas lamelas epidermais em todos os tempos estudados. Também foi possível observar que a parede das arteríolas foi fortemente corada. Sabe-se que o mTORC 2 está relacionado com a dinâmica de remodelamento do citoesqueleto (WANG et al., 2022). Segundo Parks (2017), o citoesqueleto das células epitélio basal lamelares é formado por uma rede de filamentos de actina e filamentos intermediários de queratinas que junto com desmossomos e hemidesmossomos, promovem a estabilidade morfológica celular e aderência a outras células e a membrana basal.

Quando se estudou o anticorpo para Raptor, observou-se extensa expressão na derme lamelar e sublamelar, em todos os tempos estudados. Como esta proteína está relacionada com a montagem e estabilidade estrutural e recrutamento de substrato do mTORC1, a sua função está vinculada com o crescimento celular. Função esta, que requer grande aporte de nutrientes. Nesse contexto, o cório lamelar é altamente vascularizado e é por essa região que chega o aporte nutricional ao casco. Essa rede é formada por 500 anastomoses arteriovenosas (AVA)/cm² conectando as artérias axiais com as veias da lamela dermal (POLLITT, 2004). Em processos que necessitam cicatrização, o mTORC1 ganha protagonismo, pois ele atua na dinâmica da angiogênese para promover a epitelização (WANG et al., 2022). Esse fato estreita a relação do complexo 1 com a derme, uma vez que os vasos não chegam na epiderme.

Em contraste com a expressão de Rictor, a evolução do quadro de laminite interferiu com a expressão de Raptor com aumento no início da claudicação e decréscimo já no momento seguinte. Analogamente, as células cancerígenas também são altamente dependentes da via glicolítica e preferencialmente se utilizam da via de fermentação da glicose mesmo sob condições aeróbicas, pelo processo chamado efeito Warburg (ZAMBRANO et al., 2019). Sabendo que o tecido epidermal não há aporte sanguíneo e que a chegada de oxigênio é bem dificultada, grande quantidade de glicose é necessário para o casco (WATTLE; POLLITT, 2004). Com isso, a sinalização da mTOR garante um papel central na detecção e captação de estímulos ambientais, nutrientes e fatores de crescimento para atuar no crescimento e metabolismo celular (SAXTON; SABATINI, 2017).

A imunolocalização realizada por imunistoquímica para as versões fosforiladas de RPS6 e as formas fosforiladas de Rictor e Raptor, trazem evidências que indicam o envolvimento destas proteínas na transformação fenotípica das células epitélio basal lamelares em tecido mesenquimal nas junções lamelares.

5. CONCLUSÃO

Os achados do presente trabalho comprovam o envolvimento da proteína RPS6, pela intensa fosforilação dessa não só na epiderme como também na derme lamelar e sublamelar na fase aguda da laminite séptica e demonstram, de forma inédita, as distintas prevalências da via mTORC1, que não é diretamente inibida pela rapamicina na epiderme e da via mTORC2 (sensível à rapamicina) na derme do tecido lamelar de equinos.

CAPÍTULO 3: EXPRESSÃO ESTRATIFICADA DE STAT3 FOSFORILADA NO TECIDO LAMELAR DO CASCO DE EQUINOS COM LAMINITE INDUZIDA POR OLIGOFRUTOSE

RESUMO

A proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3) tem sido associada a interleucinas, em especial IL-6, que é fosforilada na ativação celular via janus quinase (JAK), resultando em amplificação da inflamação, proliferação, angiogênese e até metástase em humanos. Foram utilizadas amostras de tecido lamelar para investigar a hipótese de que a proteína STAT3 fosforilada (p-STAT3) é expressa em células lamelares de equinos submetidos a modelo de indução de laminite por oligofrutose. As 53 amostras de 18 cavalos, foram retiradas por biópsia, prévia (Basal, n=17) e após à administração de oligofrutose, 12 horas (ETP, n=11), 36 horas (LAM, n=18) e 60-73 horas (OG3, n=7). Células positivas por imunistoquímica para p-STAT3 foram contadas na derme sublamelar e no estrato lamelar axial e abaxial e os dados submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo de Dunn para comparações múltiplas ($P < 0,05$). Raras células positivas foram encontradas em amostras CON. Contudo, em animais com laminite, houve marcada expressão de p-STAT3 na derme, em células em forma de fibroblastos ou em forma mais circular no interior ou ao redor de vasos, e, com destaque, nos ceratinócitos basais e supra basais da epiderme. Em relação ao CON, houve aumentos nas contagens celulares na derme sublamelar (7x, $P=0,0002$) e na porção axial (13x, $P < 0,0001$) em LAM e na porção abaxial (7x, $P=0,0092$) e sublamela (6x, $P=0,01$) em OG3. Esse trabalho traz novas evidências sobre a ativação da via celular JAK/STAT no desenvolvimento da laminite séptica em equinos, demonstrando potencial dessa interleucina e das moléculas dessa cascata como alvos terapêuticos na prevenção e tratamento dessa afecção catastrófica.

Palavras-chave: Janus Kinase, Interleucina-6, Inflamação, proliferação celular, angiogênese

CHAPTER 3: STRATIFIED EXPRESSION OF PHOSPHORYLATED STAT3 IN THE LAMINAR TISSUE OF HORSES WITH INFLAMMATORY LAMINITIS

ABSTRACT

The signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein has been associated with interleukins, especially IL-6, which is phosphorylated in cell activation via Janus kinase (JAK), resulting in amplification of inflammation, proliferation, angiogenesis, and even metastasis in humans. Lamellar tissue samples were used to investigate the hypothesis that phosphorylated STAT3 protein (p-STAT3) is expressed in equine lamellar cells subjected to an oligofructose-induced laminitis model. The 53 samples from 18 horses were obtained by biopsy, before (Basal, n=17) and after oligofructose administration at 12 hours (ETP, n=11), 36 hours (LAM, n=18), and 60-73 hours (OG3, n=7). Positive cells for p-STAT3 were counted in the sublamellar dermis and axial and abaxial lamellar layers by immunohistochemistry, and the data were subjected to the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test for multiple comparisons ($P < 0.05$). Rare positive cells were found in CON samples. However, in animals with laminitis, marked expression of p-STAT3 was observed in the dermis, in cells resembling fibroblasts or in a more circular form inside or around blood vessels, and, notably, in the basal and supra-basal keratinocytes of the epidermis. Compared to CON, there were increases in cell counts in the sublamellar dermis (7x, $P = 0.0002$) and axial portion (13x, $P < 0.0001$) in LAM and in the abaxial portion (7x, $P = 0.0092$) and sublamellar (6x, $P = 0.01$) in OG3. This work provides new evidence of JAK/STAT cellular pathway activation in the development of septic laminitis in horses, demonstrating the potential of this interleukin and molecules in this cascade as therapeutic targets for preventing and treating this catastrophic condition.

Keywords: Janus Kinase, Interleukin-6, Inflammation, cellular, angiogenesis

1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório vem sendo estudado extensivamente desde o início do século XIX. Um importante aspecto na patogênese de muitos tipos de doenças, que tem por objetivo, promover a cicatrização. Quando de forma localizada, os sinais clássicos da inflamação que incluem dor, rubor, calor, edema (tumor) e perda da função estão especialmente alinhados com a necessidade da reparação tecidual (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Entretanto, sinais sistêmicos podem ocorrer quando frente a uma resposta inflamatória exacerbada, podendo ou não ser resultado de um processo infeccioso (Barton e Peroni, 2018). Quando essa resposta ocorre com evidências de infecção, considera-se que há um estado de sepse, que pode ser resumido como disfunção orgânica causada pela resposta inflamatória desregulada do hospedeiro à uma infecção (SHEATS, 2019).

Em equinos com processos sépticos, em que há síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) promovida pela absorção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ao dano (DAMPs), há potencial lesivo para o estrato lamelar do casco (POLLITT, 1999). A absorção desses padrões produz uma intensa resposta inflamatória pelo organismo, com ativação de plaquetas, a qual libera mediadores vasoativos na corrente sanguínea (BAILEY et al., 2009).

A dilatação das arteríolas e vênulas, em meio a um processo inflamatório, envolve uma sequência de eventos iniciados pelo aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, seguido por estase e trombose. Além disso, a infiltração de leucócitos para os tecidos, leva a destruição tecidual por atividade proteolítica e formação de radicais livres de oxigênio, com necrose e apoptose. A remoção de restos celulares é tarefa de células fagocitárias que vão gerar novos mediadores humorais para o crescimento celular e reparação para o novo tecido conjuntivo (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Assim, mediante esses eventos, a proteína STAT3 ganha um protagonismo nesse processo. Trata-se de um importante fator de transcrição que transmite um sinal para o núcleo após a estimulação de citocinas inflamatórias, em especial a interleucina-6 (IL-6) (FORBES et al., 2016; LEISE et al., 2012).

Essa proteína, promove a transcrição de genes envolvidos na proliferação, apoptose e diferenciação celular (FORBES et al., 2016). Assim como a injúria e a falha de órgãos em humanos, é possível que a proteína STAT3 possa iniciar um papel importante mudando a

dinâmica do aparato suspensor da falange distal, em animais com laminite de origem inflamatória, pela alteração fenotípica das células epitélio basais lamelares.

Deste modo, o objetivo desse capítulo é determinar a expressão da proteína -STAT3 no tecido lamelar de equinos submetido ao modelo de indução de laminite por oligofrutose, obtido de amostras arquivadas de estudos prévios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aquisição das amostras

Um total de 53 amostras lamelares arquivadas de casco de 18 equinos, submetidos ao modelo de laminite séptica por oligofrutose, conservadas em blocos de parafina, foram utilizadas para análise, conforme a metodologia experimental aprovada pelo Comitê de Ética Sobre Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais CETEA/UFMG protocolo no 281/2013.

A metodologia de coleta das amostras de estrato lamelar coletadas através de biopsia, seguiu-se de acordo com descrição prévia (Júnior, 2017). Assim, as mesmas amostras utilizadas para o processamento para as proteínas fosforiladas RPS6 235/236, RPS6 240/244, RRICTOR e RAPTOR, (ver capítulo 1) também foram utilizadas para imunohistoquímica para p-STAT3.

2.2. Imunohistoquímica

As análises laboratoriais foram realizadas nos laboratórios do Equine Health Studies Program na Louisiana State University em colaboração com a Profa. Britta S. Leise. Para tanto, as amostras lamelares previamente fixadas em formol e embebidas em parafina foram seccionadas a 5 μ e colocadas em lâminas de vidro. Para o processo de desparafinização, as lâminas foram aquecidas para derretimento da parafina e imersas por 3 minutos em xilol (3x), transferindo para álcool 100%, imersas por 4 minutos (2x), em seguida no álcool 95%, por 4 minutos (2x) e finalizando imersas por 4 minutos na água deionizada.

Para recuperação, as amostras foram imersas em um recipiente contendo tampão de citrato (90mL H₂O + 10mL de citrato) e colocados em banho maria na temperatura de 93°C, por 10 minutos e posteriormente, descansando em temperatura ambiente por 10 minutos.

Bloqueio com peroxidase – Uma solução contendo 10mL de H₂O₂ e 90 mL de metanol foi preparado para as lâminas ficarem imersas por 10 minutos, com posterior lavagem com H₂O (2x) por 4 minutos e tampão TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20).

Bloqueio e exposição ao anticorpo – o bloqueio foi realizado com Milk 1% (0,02g leite em pó desnatado + TBST), aplicando 50µl por lâmina com o período de exposição de uma hora. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de TBST por 4 minutos (2x). Posteriormente, a aplicação de 50 µl do anticorpo primário Rabbit da *Cell Signaling Technology* STAT3 (diluição de 1:100) e coberta com uma película e postas em câmara úmida, para evitar desidratar das lâminas em geladeira sob temperatura de 3,3°C overnight. Após essa etapa, as lâminas foram imersas em TBST (2x) por 4 minutos e seguindo com a aplicação de uma gota de anticorpo secundário (Signalstain ® Boost IHC Det. (HRP, Rab), deixando descansar por 30 minutos, na câmara úmida, para posterior lavagem com TBST(2x) por 4 minutos.

O protocolo seguirá com a etapa de detecção usando o (diaminobenzidina associada ao peróxido de hidrogênio (ImmPACT® DAB), aplicando 50 µl sobre cada lâmina, deixando por 2 minutos, e lavando em seguida com H₂O_d (2x) por 4 minutos. Assim, as lâminas receberam a contra coloração de hematoxilina, seguidas de novas lavagens com H₂O_d (3x) por 3 minutos e desidratação com álcool 95% (2x 20 segundos), álcool 100% (2x 20 segundos) e xilol (2x 20 segundos). A etapa será finalizada com a aplicação de uma gota de resina (Vecta mount®) e aplicação da lamínula sobre o tecido.

2.3. Análise das imagens

As lâminas coradas com a técnica de imunoistoquímica foram obtidas seções de escaneamento robótico com o NanoZoomer Digital Pathology System e enviadas para um computador com o software NDP.view para visualização das imagens.

A metodologia aplicada seguiu a mesma realizada no capítulo 2. Inicialmente foram realizadas capturas aleatórias de telas em nove campos, com o aumento de 10x, sendo 3 abordando a região sublamelar, 3 na região axial e 3 na região abaxial das lamelas (Fig. 33).

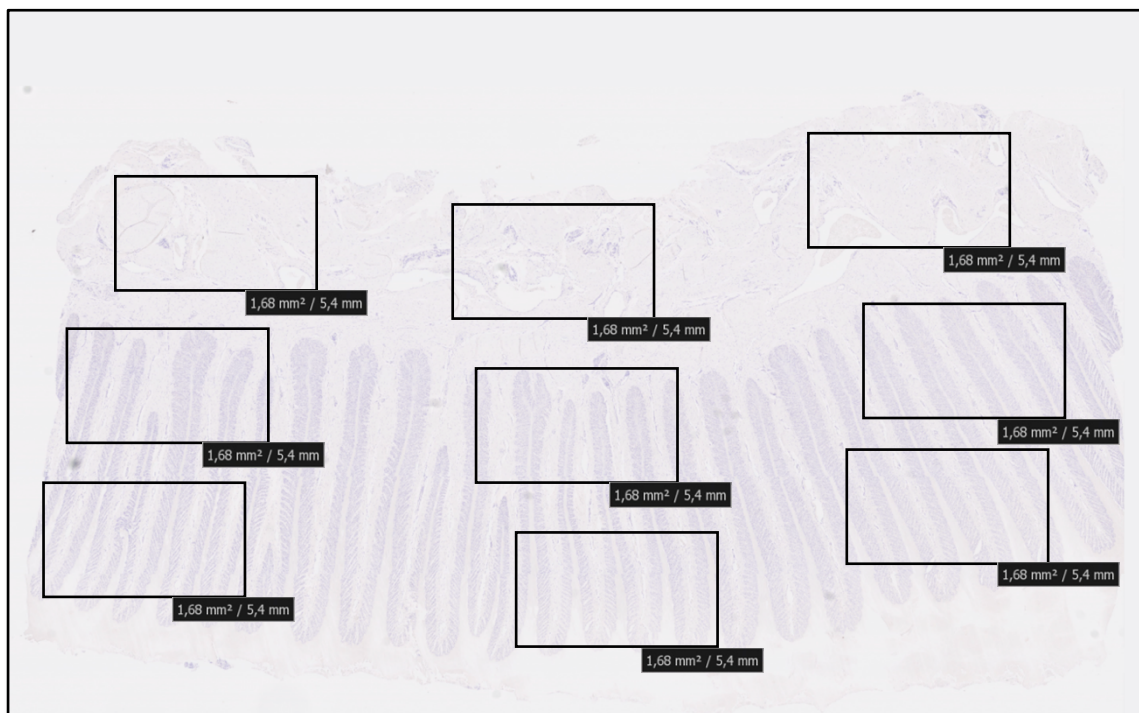


Figura 28 - Microfotografia exemplificando a contagem em 9 campos, sendo 3 na região de derme sublamelar, 3 na região axial e 3 na região abaxial das lamelas epidérmicas. Os campos foram selecionados de forma aleatória com no aumento de 10x.

Também foram realizadas 10 capturas aleatórias de tela por lâmina digitalizada, sendo 5 no aumento 40x para a região axial e 5 no aumento de 80x para a região abaxial, sempre buscando imagens com 50% da tela ocupada por epiderme e os outros 50% por derme (Fig. 34).

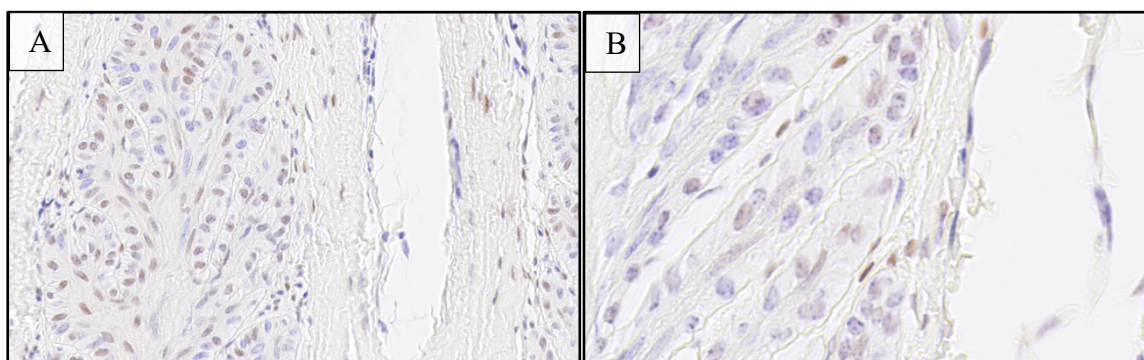


Figura 29 - Microfotografia lamelar de casco de equino submetido a o modelo de indução de laminite por oligofrutose. As imagens A e B correspondem a região axial e abaxial da lamela epidérmica, no tempo 36h, no aumento de 40x e 80x, respectivamente, para o anticorpo p-STAT3. Note que as imagens foram posicionadas de modo a ficar 50% de derme e 50% epiderme. Lâminas processadas por imunohistoquímica para imunolocalização da proteína p-STAT3.

Em seguida, as capturas foram visualizadas através do computador pessoal portátil, utilizando um software Imagem J. Nesse programa era realizado uma calibragem de acordo com a proteína a ser pesquisada e realizado a contagem de células coradas, identificadas com a coloração vermelha sobre a marcação de DAB na lamela. O resultado era obtido automaticamente e em seguida tabulado em planilha de Excel (Fig. 35).

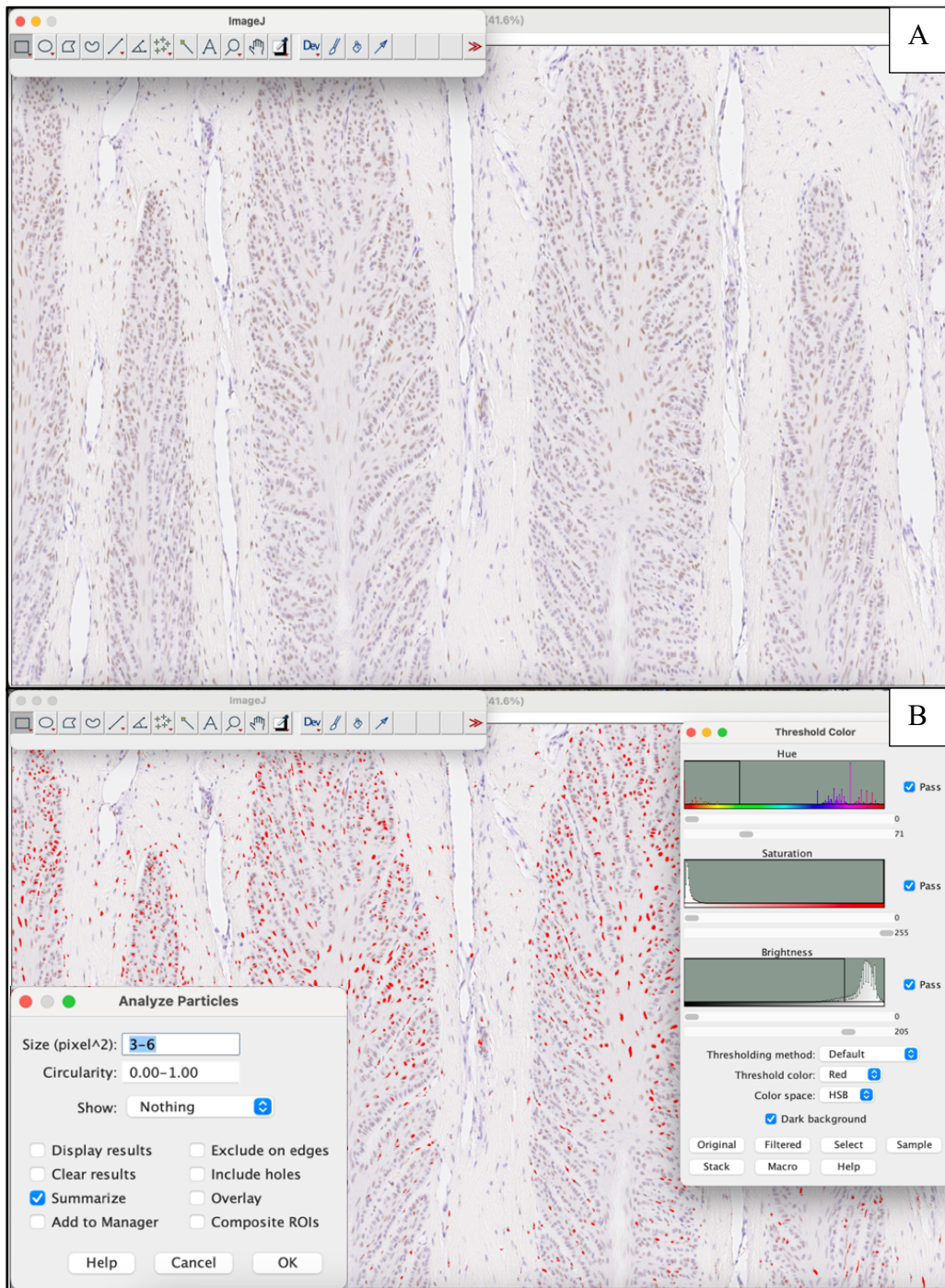


Figura 30 - Calibragem do software Image J® para contagem de pixel de tamanho variando 3-6, corada para a p-STAT3 no aumento de 10x. As imagens capturadas foram enviadas para o programa Image J® e usado a função Threshold Color para calibrar o espectro de cor (Hue) a saturação e a intensidade da marcação (Brightness) do DAB referente ao p-STAT3. Em A representa a imagem antes da calibragem. B representa a imagem após a calibragem. Note a marcação do software em vermelho sobre a marcação marrom do DAB.

2.4. Análise estatística

Foi utilizado o software estatístico Graphpad Prism 9. (Graphpad, EUA). Os dados foram analisados para distribuição normal pelos testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Em caso de distribuição normal, utilizou-se o teste de Anova seguido do teste de Tukey para comparação entre as médias. Em caso negativo utilizou-se o teste de de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. Para todos os testes considerou-se nível de significância de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Nas amostras basais e ETP poucas células foram contadas para p-STAT3. No entanto, as marcações de DAB surgiram no grupo OG1, se estendendo para o grupo OG3. A imunolocalização de p-STAT3 foi observada na derme lamelar, sublamelar, região axial e abaxial das lamelas epidermais. Na Figura 35, demonstra a ocorrência da marcação no tecido lamelar, nos diversos tempos estudados.

No campo de 10x, ao analisar a contagem da derme (Fig. 36A), percebeu-se que no tempo 12h (ETP), a média (aproximadamente 200 células/mm²) esboçou um aumento em relação o tempo basal (aproximadamente 50 células/mm²). Estatisticamente, esse aumento foi nítido ao comparar o grupo controle com o grupo OG1 ($P=0.0002$) (aproximadamente 400 células/mm²) e OG3 ($P=0.0132$) (aproximadamente 350 células/mm²).

Ao avaliar a expressão de p-STAT3 na região epidermal axial, as médias de todos os grupos esboçaram um aumento em relação ao tempo basal. No entanto, o grupo OG1 apresentou $p<0.0001$. Na região abaxial o grupo OG3 apresentou $P=0.0092$ em relação ao tempo controle (Fig. 37).

Nos tempos OG1 (36h após indução de laminite por oligofrutose) e OG3 (60-73h), a marcação de DAB para p-STAT3 foi evidente principalmente nos núcleos das células epidermais e fibroblastos (Fig. 38). No tecido lamelar axial, observaram-se aumentos de 48 vezes no tempo 36h ($P<0,0001$) e 26,4 vezes no OG3 ($P=0.0233$) em relação ao tempo basal. Reação semelhante foi evidenciada na região abaxial nos tempos 36h ($P<0,0001$) e OG3 ($P=0,0082$), com aumento de 34,7 e 30,8, respectivamente.

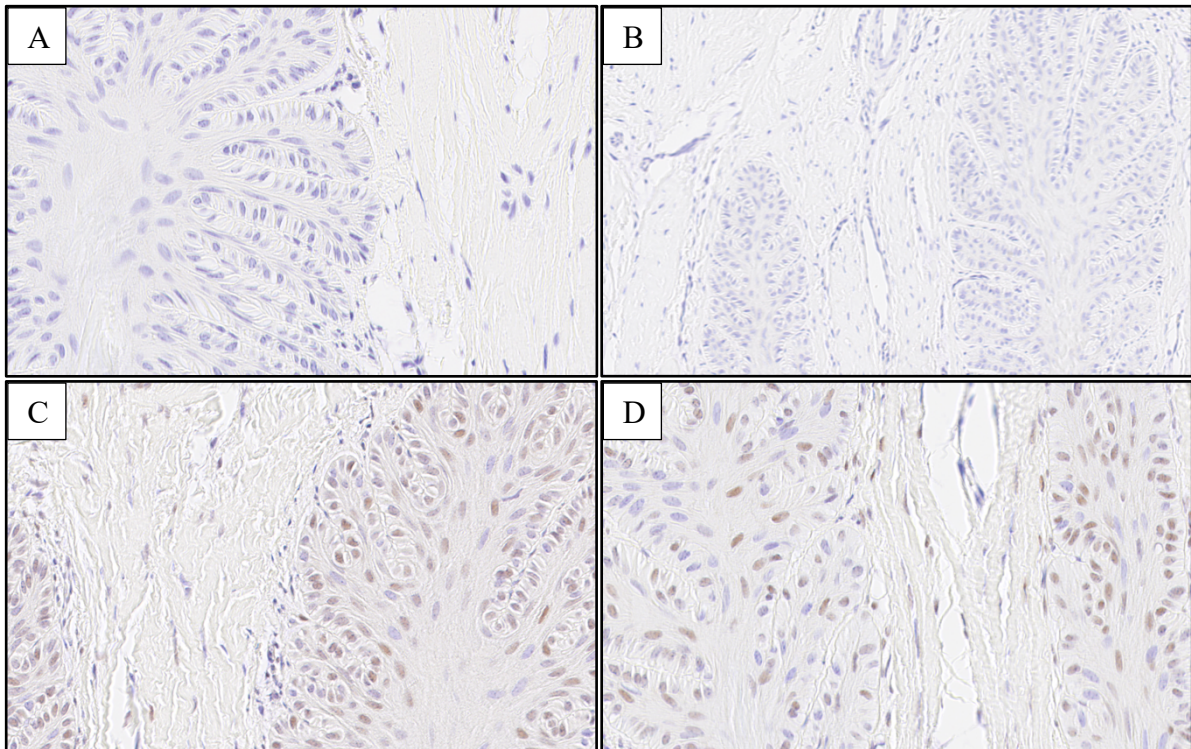


Figura 32 - Microfotografia demonstrando células positivas p-STAT3 na região apical do tecido lamelar de 18 equinos com laminite relacionada a sepse (marcação em marrom por DAB e hematoxilina na contracoloração). **A** representa o grupo CON. Note que não foi observada marcação de células positivas. Isso foi observado na imagem **B** representando 12 horas após a indução da laminite; **C** 36h após a indução (LAM), tanto a derme quanto a epiderme se encontram com marcações nos núcleos das células; e na imagem **D** 60-73 horas (OG3), as marcações continuam no tecido de derme lamelar e no núcleo das células epidérmicas, após a administração de oligofrutose.

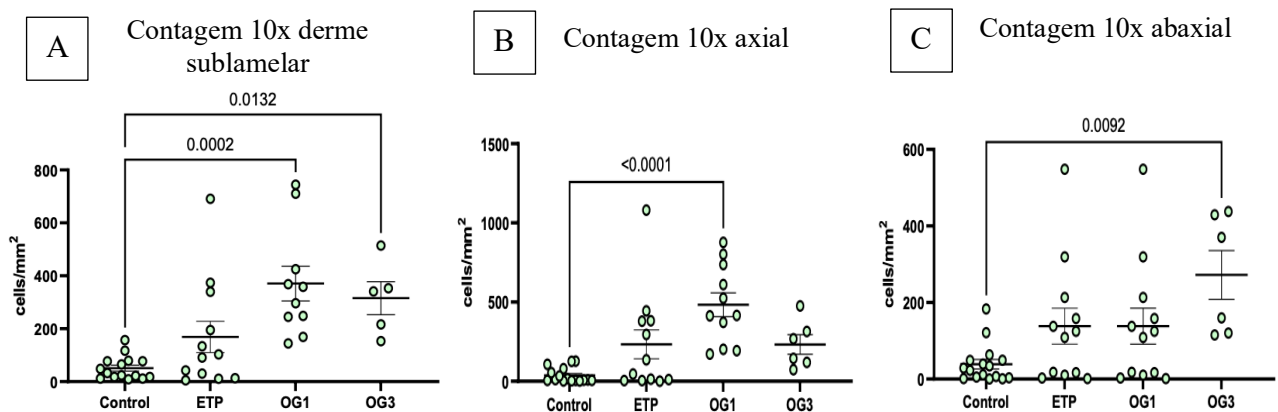


Figura 31 - Contagem de células positivas para p-STAT3 nos diferentes tempos estudados e nas regiões de derme (A), epiderme axial (B) e epiderme abaxial (C), no aumento de 10x.

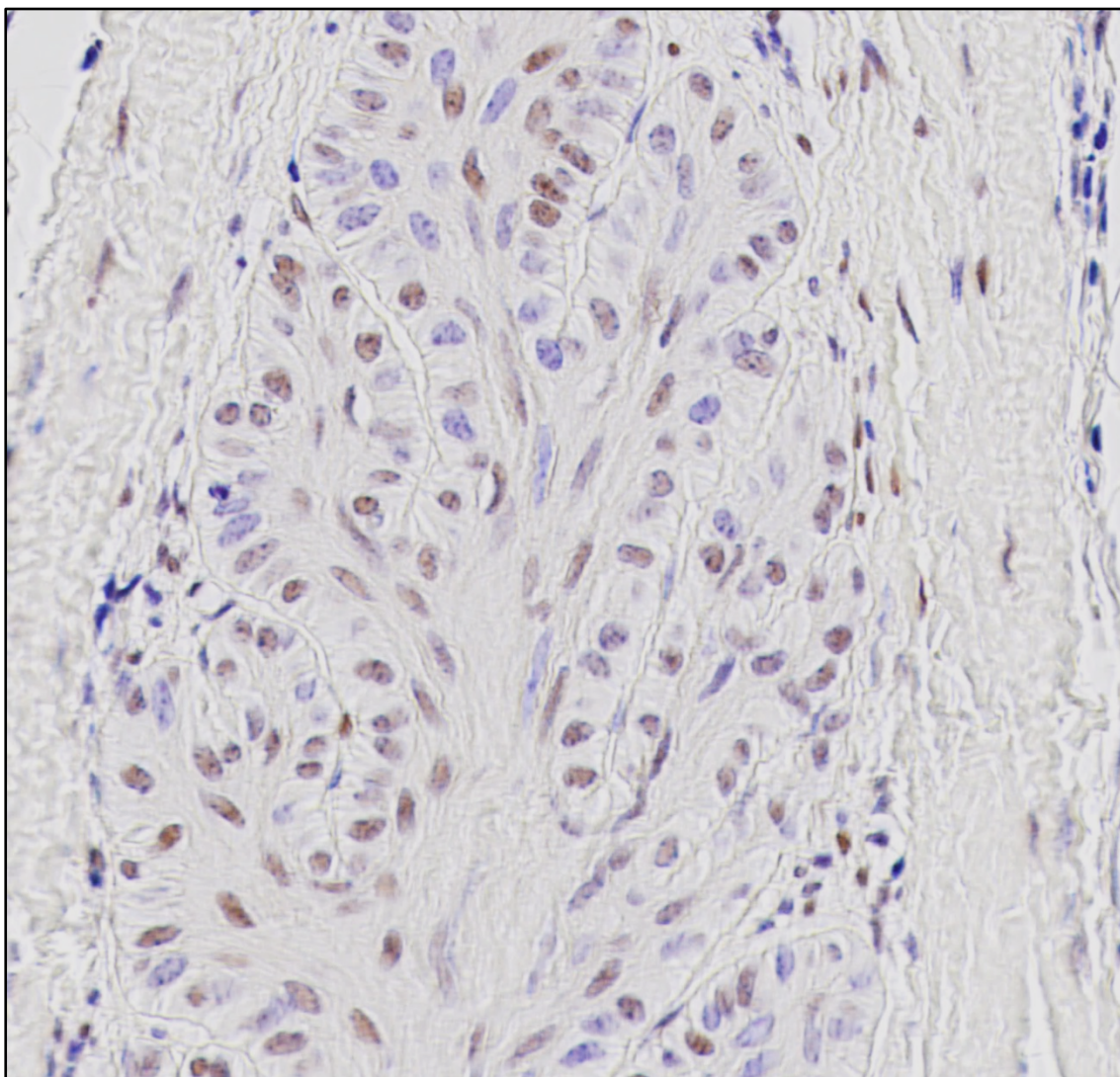


Figura 33 - Microfotografia do ápice da lamela epidermal primária, no tempo 36h, demonstrando núcleo dos queratinócitos alongados (seta verde) corados por DAB, para p-STAT3. Note também o núcleo de alguns de fibroblastos marcados de marrom na região de derme lamelar (seta vermelha).

4. DISCUSSÃO

Segundo Kishimoto (2021), a sinalização da proteína STAT3 está envolvida em processos de caráter imunológico e inflamatório. A administração de oligofrutose produz uma resposta inflamatória sistêmica, que tem como lesão remota, as lamelas do casco pelo processo patológico da laminite (VAN EPS; POLLITT, 2006). Esse trabalho buscou avaliar a expressão da proteína p-STAT3 no modelo de indução de laminite por oligofrutose, desde a fase prodrômica até a fase aguda, com o surgimento dos primeiros sinais clínicos (OG1) e a evolução destes (OG3).

Segundo Sano et al. (2005) em tecido queratinócitos humanos com lesões de psoríase, a ativação de STAT3 ocorreu em mais de 90% do tecido epidermal. Em experimento conduzido

em ratos, a expressão de STAT3 ativada ocorreu sumariamente em queratinócitos que apresentavam lesões de pele, indicando que essa proteína desempenha um papel chave no desenvolvimento de doenças inflamatórias (KISHIMOTO, 2021).

O presente trabalho demonstra que, assim como a psoríase e o câncer que ocorre em humanos, na laminite em equinos, submetido ao modelo de indução por oligofrutose, a expressão da proteína STAT3 na sua versão fosforilada, está envolvida na patogênese da doença. Segundo Leise et al. (2012), a expressão da proteína p-STAT3 ativada desempenha um papel importante na falha lamelar visto nos modelos de indução de laminite por sepse (extrato de noqueira preta e sobrecarga de carboidrato), fato similar que ocorre em humanos com sepse.

Segundo Dern et al. (2020), a presença de p-STAT3 só ocorre no epitélio lamelar. Resultado evidenciado pela técnica de imunofluorescência. Nosso trabalho corrobora com os achados de Leise et al., (2012). Pois a fosforilação de STAT3 não fica restrita ao epitélio lamelar. Pelo contrário, a região de derme profunda (sublamelar) e região epidermal também foi possível evidenciar fosforilação de STAT3, pela técnica de imunistoquímica.

De acordo com Leise et al. (2012), a imunolocalização das células positivas para p-STAT3 foi o núcleo das CEBLs e células da derme (suspeita de neutrófilos ou macrófagos). Esse trabalho evidenciou imunolocalização semelhante nas CEBLs, sendo que na derme, além de células do sistema imune, suspeitamos do envolvimento de fibroblastos. No tecido lamelar axial, observaram-se aumentos de 48 vezes no tempo 36h ($P < 0,0001$) e 26,4 vezes no OG3 ($P = 0,0233$) em relação ao tempo basal. Reação semelhante foi evidenciada na região abaxial nos tempos 36h ($P < 0,0001$) e OG3 ($P = 0,0082$), com aumento de 34,7 e 30,8, respectivamente.

Nosso trabalho mostra que o pico de p-STAT3, na derme sublamelar, ocorreu no tempo 36h, utilizando o modelo de indução por oligofrutose. Segundo Visser e Pollitt (2011), utilizando o mesmo modelo de indução de laminite, a infiltração leucocitária ocorreu após 24h, enquanto a expressão genica de IL-6 ocorreu 12h mais cedo. Fato semelhante ocorreu no modelo de indução por sobrecarga de carboidratos. Onde a expressão de quimiocinas ocorreu antes mesmo do pico de infiltração leucocitária (FALEIROS et al., 2011a; FALEIROS et al., 2011b). De acordo com Faleiros et al. (2011b), o pico de infiltração leucocitária e o estresse epitelial, no modelo de sobrecarga de carboidrato, ocorre no início da claudicação (OG1). Isso demonstra um padrão temporal diferente do modelo de extrato de noqueira preta, onde o pico de infiltração leucocitária antecede o estresse epitelial (FALEIROS et al., 2009). Tais achados podem ser explicados pois a IL-6, principal ativador da via JAK/STAT3 (ROSE-JOHN, 2020), é sintetizada por leucócitos e fibroblastos (GOMES et al., 2009).

Os leucócitos, ainda dentro dos vasos, produzem citocinas e quimiocinas que passam com maior facilidade para os tecidos, através de uma instabilidade hemodinâmica. Leise et al. (2011), observou, no modelo de sobrecarga de carboidratos, que o influxo de IL-6 ocorre quando o paciente desenvolve claudicação Obel Grade 1. Esse influxo é acompanhado da expressão de IL-1 β , ICAM-1 e E-Selectina, demonstrando a alta atividade e dinâmica do endotélio vascular. Tal evento precede a chegada de citocinas no tecido dermal. Por ser constituído principalmente de fibroblastos, uma vez ativado por citocinas (IL-6) (Rose-John, 2022), estes passam a produzir quimiocinas para atrair leucócitos para o tecido lamelar (FALEIROS et al., 2011b). Deste modo, o complexo IL-6 e IL-6R vai se associar com a gp130 ativando a via JAK/STAT3 (ROSE-JOHN, 2022).

A IL-6 parece ser um elo comum entre a via JAK STAT3 e a via PI3K/ mTOR/RPS6, na lamina de origem inflamatória. Nosso trabalho mostra que tanto a p-STAT3 quanto a p-RPS6 aumentam sua expressão no tempo OG1, na região sublamelar. Segundo Yo et al. (2021), a STAT3 pode desencadear uma cascata de eventos moleculares que levam à ativação da via da mTOR e à produção de RPS6, contribuindo para a proliferação celular. A regulação da expressão e ativação dessas proteínas é importante na regulação do crescimento e desenvolvimento celular, bem como na patogênese de várias doenças, incluindo câncer e doenças inflamatórias crônicas (YO et al., 2021).

Na lamela axial, o pico de STAT3 ocorreu em OG1 (36h), enquanto o pico de RPS6 ocorreu em OG3 (60-73h), sendo sustentado na lamela abaxial em OG3, para ambas as proteínas. Isso pode ser explicado pois a região axial é mais próxima da derme sublamelar. Assim, o estímulo inicial possivelmente vem dos vasos sanguíneos situados na derme, necessitando de mais tempo para que as células epitélio basais lamelares se tornem inflamadas (FALEIROS et al., 2009; LEISE et al., 2011) e possam se tornar positivas para p-STAT3.

A técnica de imunistoquímica realizada nesse trabalho mostrou-se superior a imunofluorescência realizada por Dern et al. (2020), pois foi possível identificar a expressão de p-STAT3 não só no tecido epitelial, mas também em toda a junção lamelar. Outro fato importante é que nosso trabalho proporcionou avaliar as alterações até o grau Obel Grade 3, caracterizado pela deambulação dificultosa e a relutância e resistência vigorosa de erguer o membro.

5. CONCLUSÃO

A expressão da proteína STAT3 na versão fosforilada ocorre em todos os estratos das junções lamelares no modelo de indução de laminite por oligofrutose. No entanto seu pico ocorre 36h após a indução de laminite na derme sublamelar e região de lamela axial. Na região de lamela abaxial o pico só é atingido em OG3. Esse trabalho trouxe evidências inéditas da sinalização intracelular que pode estar envolvido na dinâmica da mudança fenotípica do tecido lamelar de equinos submetido ao modelo de indução de laminite por oligofrutose.

CAPÍTULO 4 - CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO LAMELAR DE CALPROTECTINA E DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS COM PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM EQUINOS COM LAMINITE

RESUMO

Embora os esforços extensivos realizados para desvendar a patofisiologia da injúria de órgãos relacionados à sepse, a laminite em equinos continua com poucas modalidades terapêuticas com potencial para sua prevenção ou resolução. O objetivo desse trabalho foi avaliar a correlação entre a expressão das proteínas Rictor, Raptor, p-STAT3, p-RPS6 (240/244) e calprotectina, para determinar relações que sinalizem potenciais alvos terapêuticos. Foram utilizadas amostras arquivadas do tecido lamelar de equinos submetido a laminite por oligofrutose. As 53 amostras oriundas de 18 cavalos, foram obtidas por biópsia, prévia (Basal, n=17) e após à administração de oligofrutose, 12 horas (ETP, n=11), 36 horas (LAM, n=18) e 60-73 horas (OG3, n=7). Anticorpos primários para p-STAT3 e p-RPS6(Ser240/244), Rictor, Raptor e calprotectina foram usados para imunolocalizar a expressão dessas proteínas em tecido lamelar equino. Para análise estatística foi utilizado o teste de correlação de Person ($P < 0,05$). Destacaram-se as correlações entre as proteínas indicadoras de inflamação (calprotectina e p-STAT3) e dessas com p-RPS6. Dentro da mesma camada, a expressão de calprotectina se correlacionou ($P < 0,01$) com p-STAT3 na sublamela ($r=0,55$) e na lamela abaxial ($r=0,57$). Da mesma forma, p-RPS6 se correlacionou ($P < 0,05$) com calprotectina ($r=0,54$) e p-STAT3 ($R=0,34$) na sublamela e a de calprotectina ($r=0,60$) na lamela axial. Adicionalmente, houve correlação positiva ($P < 0,05$) de Raptor com p-RPS6 ($r=0,39$), p ($r=0,43$) e calprotectina ($r=0,50$), mas apenas na sublamela. Tais observações sugerem que as fosforilações de RPS6 e STAT ocorrem de forma concomitante entre elas e de acordo com o aumento da concentração de calprotectina. Esses resultados agregam evidências à teoria de que a inflamação promovida pelo aumento das concentrações da citocina IL-6 (desencadeadora de p-STAT3) e da infiltração leucocitária (fonte e indutora de calprotectina) no tecido lamelar está diretamente associada à ativação da via mTOR, que justifica alterações funcionais e histológicas da laminite como desprendimento dos certatinócitos da membrana basal e falha do aparato suspensor da falange distal. Tomados em conjunto, tais achados corroboram o potencial de componentes das vias celulares mTOR/RPS6 e IL-6/gp130 como potenciais alvos terapêuticos na laminite relacionada à sepse em equinos.

Palavras-chave: proteínas de sinalização, oligofrutose, inflamação, laminite

CORRELATION AMONG THE LAMELLAR EXPRESSION OF CALPROTECTIN AND PROTEINS ASSOCIATED TO CELL MIGRATION AND PROLIFERATION IN HORSES WITH LAMINITIS

ABSTRACT

Despite extensive efforts to unravel the pathophysiology of sepsis-related organ injury, equine laminitis still has few therapeutic modalities with potential for its prevention or resolution. The aim of this study was to evaluate the correlation between the expression of Rictor, Raptor, p-STAT3, p-RPS6 (240/244) and calprotectin proteins, to search for among those potential therapeutic targets. Archived samples of equine lamellar tissue subjected to oligofructose-induced laminitis were used. The 53 samples from 18 horses were obtained by biopsy, before (Basal, n=17) and after oligofructose administration, at 12 hours (ETP, n=11), 36 hours (LAM, n=18) and 60- 73 hours (OG3, n=7). Primary antibodies for p-STAT3 and p-RPS6(Ser240/244), Rictor, Raptor and Calprotectin were used to immunolocalize the expression of these proteins in equine lamellar tissue. The Person correlation test was used for statistical analysis ($P<0.05$). Correlations between inflammatory proteins (calprotectin and p-STAT3) and among these and p-RPS6 were highlighted. Within the same layer, calprotectin expression was correlated ($P<0.01$) with p-STAT3 in the sublamella ($r = 0.55$) and in the abaxial lamella ($r=0.57$). Similarly, p-RPS6 correlated ($P<0.05$) with calprotectin ($r=0.54$) and p-STAT3 ($r=0.34$) in the sublamella and with calprotectin ($r=0.60$) in the axial lamella. Additionally, there was a positive correlation ($P<0.05$) of Raptor with p-RPS6 ($r=0.39$), p-STAT3 ($r=0.43$), and calprotectin ($r=0.50$), but only in the sublamella. These observations suggest that the phosphorylations of RPS6 and STAT occur concomitantly with each other and according to the increase in calprotectin concentration. These results provide evidence for the theory that inflammation promoted by increased concentration of the cytokine IL-6 (triggering p-STAT3) and leukocyte infiltration (source and inducer of calprotectin) in the lamellar tissue is directly associated with the activation of the mTOR pathway, which justifies functional and histological alterations in laminitis such as detachment of the basement membrane keratinocytes and failure of the suspensory apparatus of the distal phalanx. Taken together, these findings support the potential of the mTOR/RPS6 and IL-6/gp130 cellular pathways as potential therapeutic targets in sepsis-related laminitis in horses.

Keywords: signaling proteins, oligofructose, inflammation, laminitis

1. INTRODUÇÃO

Frequentemente o tecido epidermal é desafiado por vários fatores externos e internos que resultam em dano. Desta forma, para promover a restauração da estrutura danificada a epiderme precisa atuar de maneira dinâmica, reagindo a estímulos ambientais, para que as perturbações da integridade do tecido não o tornem vulneráveis à processos lesivos (WANG et al., 2022).

Em meio às adversidades fisiológicas, as células são induzidas a promover o crescimento, migração, sobrevivência e angiogênese em resposta a citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e aminoácidos (POPOVA; JÜCKER, 2021).

Na laminite de origem inflamatória, em equinos, esse processo não é diferente. A cascata inflamatória desencadeia reações e atividades celulares que se manifestam, buscando reparar o tecido. Dessa forma, o recrutamento de células do sistema imune detectadas pela expressão de calprotectina (COTA, 2021; FALEIROS et al., 2011) pode estar vinculado com a sinalização intracelular capaz de induzir migração de células epidermais (LANE et al., 2017; DERN et al., 2020).

Como visto nos capítulos anteriores, as vias de sinalização intracelular mTOR e STAT3, parecem ter um envolvimento importante no desenvolvimento da laminite em equinos. Segundo Leise et al. (2012), a proteína p-STAT3 é fortemente associada aos estágios iniciais da laminite. Por outro lado, estudos indicam o envolvimento da via mTOR com a expressão da RPS6 fosforilada (LANE et al., 2017).

Este capítulo tem como objetivo correlacionar um marcador de células inflamatórias (calprotectina) e proteínas de sinalização intracelular p-STAT3, Rictor, Raptor e p-RPS6, para entender a dinâmica de interações destas vias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aquisição das amostras

Para a realização das correlações entre as proteínas pesquisadas, foi utilizado dados oriundos dos capítulos anteriores. Assim, os resultados de p-RPS6 (240/244), p-STAT3, Rictor e Raptor, foram correlacionados. Adicionalmente aos dados anteriormente computados, realizou-se também a marcação e contagem para células positivas para calprotectina nas amostras de tecido lamelar.

Para tanto, a realização do protocolo de processamento de imunistoquímica para calprotectina seguiu-se com as amostras lamelares previamente fixadas em formol e embebidas em parafina

foram seccionadas a 5 μ e montadas em lâminas de vidro. Para o processo de desparafinização, as lâminas foram aquecidas para derretimento da parafina e imersas por 3 minutos em xilol (3x), para subsequentes imersões (2x por 4 minutos) em etanol a 100%, a 95% e em água deionizada.

Para recuperação antigênica, as amostras foram imersas em um recipiente contendo tampão de citrato (90mL H₂O + 10mL de citrato) e colocados em banho maria na temperatura de 93°C, por 10 minutos, seguidas por repouso em temperatura ambiente por mais 10 minutos.

O bloqueio de peroxidase foi realizado por imersão em uma solução contendo 10mL de H₂O₂ e 90 mL de metanol por 10 minutos, com posterior lavagem com H₂O (2x) por 4 minutos e tampão TBST (Salina tamponada TRIS com Tween 20). Já o bloqueio antigênico inespecífico foi realizado por aplicação imersão da amostra em solução de leite em pó desnatado (1%) em TBST por uma hora. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de TBST por 4 minutos (2x).

Para a marcação com calprotectina, utilizou-se o anticorpo primário MAC 387 em diluição de 1:200, sendo aplicado 20 μ l por lâmina e deixado overnight. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de TBST (2x) por 4 minutos, para aplicação de 50 μ l anticorpo secundário em cada lâmina. Este foi utilizado Anti mouse IgG (diluição de 1:100) e deixado por uma hora em câmara úmida. Posteriormente, foram realizadas novas lavagens com TBST (2x de 4 minutos) para prosseguir com a aplicação de 100 μ l de ABC (1 gota do reagente A + 1 gota do reagente B + 2,5mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS)) e deixadas por 30 minutos em câmara úmida, sendo lavada novamente com TBST (2x de 4 minutos).

O protocolo seguiu com a etapa de detecção usando o (diaminobenzidina associada ao peróxido de hidrogênio (ImmPACT DAB). Nessa etapa, foi preparado a reação de peroxidase com o ImmPACT DAB Substrate Kit, Peroxidase (HRP) – (SK-4105), da Vector Laboratories, com uma gota do ImmPACT DAB Reagent 1 em 1mL do ImmPACT DAB Diluent, em um eppendorf escuro (Marrom). Em cada lâmina foi aplicado 50 μ l e deixado por 2 minutos. Em seguida, lavagens foram realizadas com H₂O (2x) por 4 minutos para receberem a contra coloração de hematoxilina, seguidas de novas lavagens com H₂O (3x) por 3 minutos e desidratação com álcool 95% (2x 20 segundos), álcool 100% (2x 20 segundos) e xilol (2x 20 segundos). A etapa foi finalizada com a aplicação de uma gota de resina (Vecta mount®) e aplicação da lamínula sobre o tecido.

2.2. Análise das imagens

Após montadas, as lâminas foram submetidas a escaneamento robótico com o NanoZoomer Digital Pathology System e enviadas para um computador com o software NDP.view para visualização e captura de imagens.

Inicialmente, foram realizadas capturas aleatórias de telas em nove campos, com o aumento de 10x, de modo semelhante a contagem de p-RPS6 e p-STAT3, sendo 3 abordando a região sublamelar, 3 na região axial e 3 na região abaxial das lamelas.

Em seguida, as capturas foram processadas através do computador pessoal portátil, utilizando o software Imagem J (Fig. 39). Nesse programa era realizado uma calibragem específica para calprotectina e realizado a contagem de células coradas, identificadas com a coloração vermelha sobre a marcação marrom de DAB na lâmina. O resultado era obtido automaticamente e em seguida tabulado em planilha de Excel.

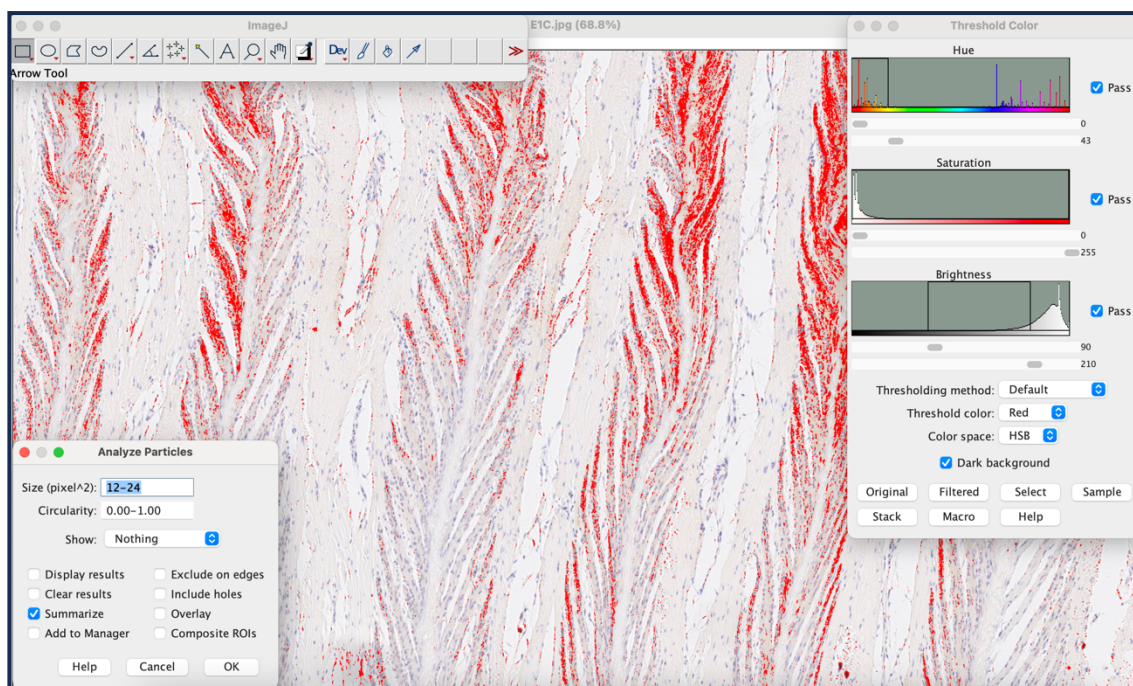


Figura 34 - Calibragem para contagem de células positivas para calprotectina.

2.3. Análise estatística

Utilizou-se o software estatístico Prism 9 (Graphpad, EUA). As contagens de células marcadas nas diversas camadas (sublamela e lamela axial e abaxial) foram comparadas em duplas utilizando-se o teste de correlação de Pearson. O nível de correlação foi classificado, tanto em caso de índices positivos como negativos, como fraco ($r < 0,25$), leve (entre 0,26 a 0,50),

moderado (entre 0,51 a 0,75) ou alto ($>0,75$). Para todos os testes considerou-se nível de significância de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse estudo buscou correlacionar as proteínas p-RPS6, Rictor, Raptor, p-STAT3 e calprotectina, para explicar fatores intrigantes envolvidos na patogenia da laminite de origem séptica. Portanto, o uso da calprotectina, foi fundamental, visto que na dinâmica da sinalização intracelular da p-RPS6 do presente trabalho se assemelha com a expressão da calprotectina no trabalho de Faleiros et al. (2011).

Os dados referentes às contagens de células positivas para calprotectina estão representadas na Fig. 2. Na região axial foi possível evidenciar um aumento no grupo OG1 ($P = 0,0181$) em relação aos grupos controle e ETP. Isso ficou mais nítido ao comparar o grupo controle com OG3 ($P = 0,0002$). Na região abaxial, os grupos OG1 e OG3 também apresentaram valores maiores quando comparados com o grupo controle ($P = 0,0444$ e $P = 0,0016$, respectivamente).

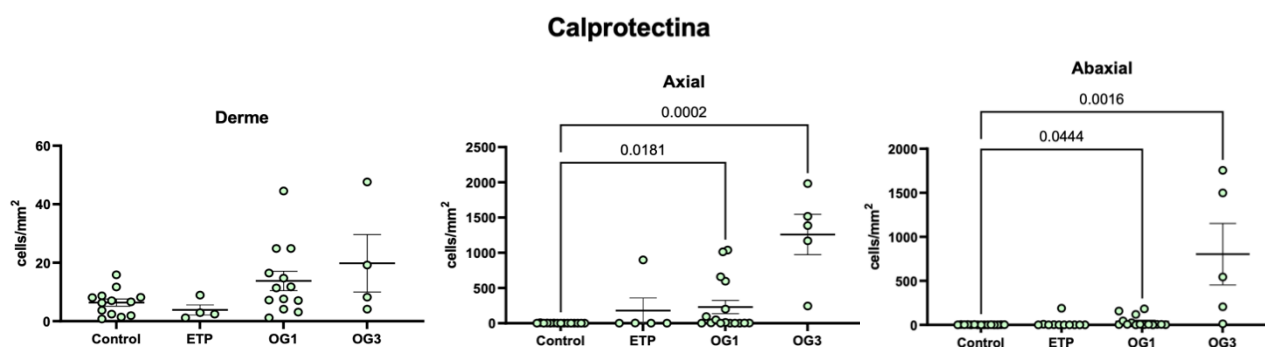


Figura 35 - Médias e erros-padrão das contagens de células positivas para calprotectina em equinos submetidos ao modelo de laminite, nos momentos antes (CONTROL) e 12h (ETP) e 36 horas (LAM) depois da administração gástrica de oligofrutose e quando a claudicação evoluiu para grau 3 de Obel (60 a 72 horas).

Nesse trabalho foi possível observar correlações positivas de intensidade fraca, leve e moderada, além de correlações negativas fracas e leves, as quais não serão abordadas no texto, mas que podem ser visualizadas nas Fig. 41 e 42.

Ao comparar as contagens de calprotectina com p-RPS6, ambas na sublamela, apresentou uma correlação moderada ($P < 0,01$; $r = 0,54$). A calprotectina na sublamela também apresentou correlação moderada com p-RPS6 na axial ($P < 0,01$; $r = 0,67$). e abaxial ($P < 0,01$; $r = 0,51$). Quando comparamos a calprotectina e p-RPS6 na posição axial apresentou correlação moderada ($P < 0,01$; $r = 0,60$) e p-RPS6 axial com calprotectina abaxial ($P < 0,01$; $r = 0,64$).

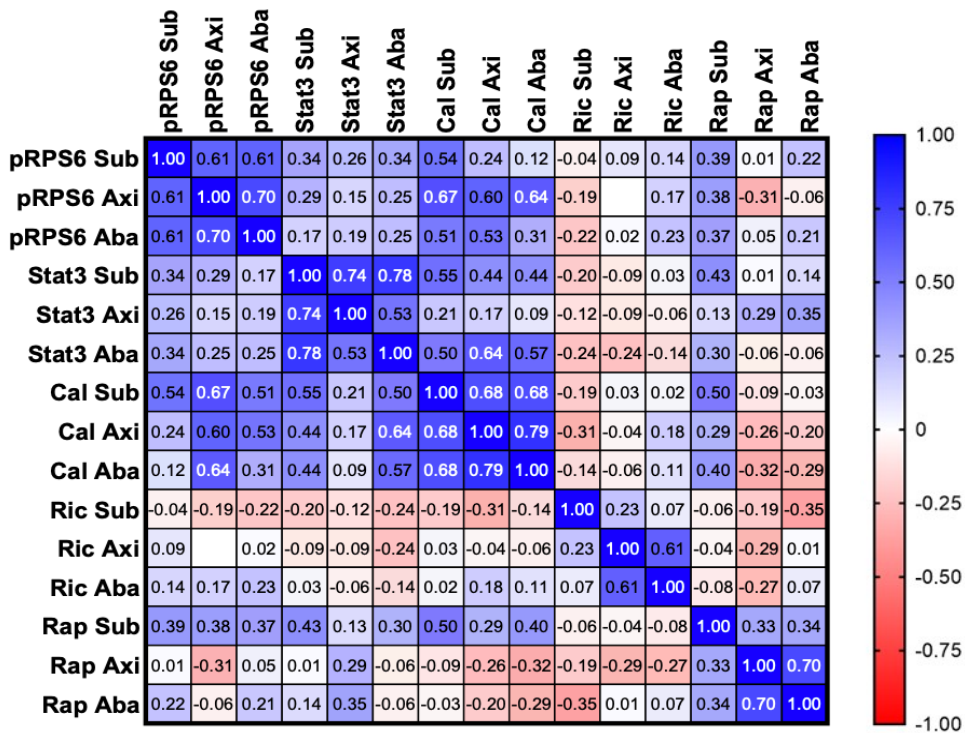


Figura 36 - Índices de correlação (Pearson) entre contagens de células positivas para calprotectina e proteínas de sinalização intracelular p-STAT3, p-RPS6, Rictor e Raptor no tecido lamelar de equinos submetidos a laminite relacionada à seps. Coluna da direita demonstra o valor de r em escala de cor para a correlação fraca, leve, moderada e forte.

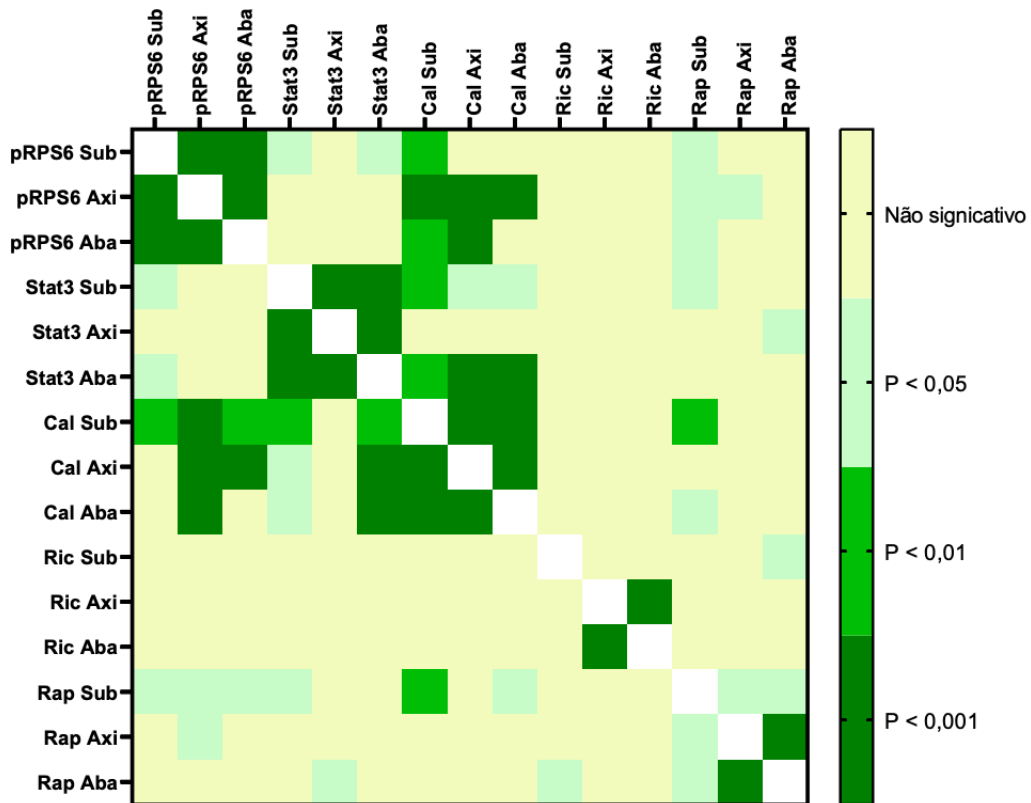


Figura 37 - Diagrama de cores correspondentes a valores de P obtidos pela correlação (Pearson) entre contagens de células positivas para calprotectina e proteínas de sinalização intracelular p-STAT3, p-RPS6, RICTOR e RAPTOR no tecido lamelar de equinos submetidos a laminite relacionada à seps. Coluna da direita demonstra nível de significância de acordo com a em escala de cores.

Para comparar a sinalização inflamatória entre Calprotectina e p-STAT3, essas foram correlacionadas nas porções de derme sublamelar, axial e abaxial. Entre p-STAT3 e calprotectina, ambas sublamelar ($P < 0,01$; $r = 0,55$) apresentando correlação moderada; STAT3 sublamelar e calprotectina axial e abaxial ($P < 0,05$; $r = 0,44$), apresentando leve correlação. Quando comparamos p-STAT3 na posição abaxial e calprotectina nas posições sublamelar, axial e abaxial ($P < 0,01$; $r = 0,50$; $r = 0,64$; $r = 0,57$, respectivamente), apresentou correlação moderada.

Enquanto o Rictor não apresentou correlações significativas com as proteínas pesquisadas, o Raptor sublamelar apresentou leve correlação positiva com p-RPS6 na derme sublamelar, axial e abaxial ($P < 0,05$; $r = 0,39$; $r = 0,38$; $r = 0,37$, respectivamente). Também foi possível observar leve correlação positiva de Raptor sublamelar com Calprotectina sublamelar e abaxial ($P < 0,01$; $r = 0,50$; $P < 0,05$; $r = 0,40$, respectivamente). A p-STAT3 apresentou correlação leve com o Raptor na posição sublamelar ($P < 0,05$; $r = 0,43$).

Estudos recentes sugerem o envolvimento de proteínas de sinalização intracelular na patofisiologia da laminite, indicando possíveis alvos terapêuticos (Leise et al., 2012; Lane et al., 2017; Dern et al., 2020). Nosso trabalho proporcionou avaliar a relação das proteínas Rictor, Raptor, RPS6 e p-STAT3 na patofisiologia da laminite relacionada a sepse. Além disso, o trabalho propõe correlacionar essas proteínas com a expressão de calprotectina no tecido lamelar de equinos, submetido ao modelo de indução de laminite por oligofrutose.

A calprotectina é um marcador de células inflamatórias (neutrófilos e monócitos ativados), mas também expresso em células epidermais que tenham sofrido sinalização inflamatória (FALEIROS et al., 2011). Nesse contexto, a IL-6 é considerada uma das citocinas pró-inflamatórias mais promissoras, produzida por leucócitos (ROSE-JOHN, 2020). Ao comparar a calprotectina com STAT3 era de se esperar que apresentasse uma correlação de moderada a intensa. Isso por que a sinalização JAK/STAT3 é a principal rota de sinalização influenciada por IL-6 (YANG et al., 2016). Assim, as correlações moderadas evidenciadas entre Cal Sub x p-STAT3 Sub; Cal Sub x p-STAT3 Aba ($r = 0,55$; $r = 0,50$, respectivamente) e Cal Axi x p-STAT3 Aba ($r = 0,64$), demonstram que na região de derme sublamelar, a STAT3 foi ativada (em OG1 ($P = 0,0002$) e OG3 ($P = 0,0132$)) antes do aumento da expressão de calprotectina. Tal característica, sugeri uma sinalização mais precoce da STAT3 nessa região. A ICAM-1 é uma molécula de adesão presente em fibroblastos e no endotélio vascular. Ela tem uma importante ação no sistema imune, pois promove lesão ao endotélio vascular em resposta a angiotensina II. Isso permite a adesão e migração leucocitária para os tecidos. Por se tratar de uma molécula,

a IL-6 é menor que um leucócito. Assim, o vaso permeável, facilita a passagem de moléculas menores (GOMES et al., 2009; LEISE, 2018). Desta forma, era de se esperar que a via de fosforilação de STAT3 na derme sublamelar mais precoce, pelo estímulo de IL-6 oriundo dos grades vasos presentes nessa região (LEISE et al., 2011).

No entanto, quando avaliado na região de lamela axial, tanto a STAT3 ($P < 0,0001$) quanto a calprotectina ($P = 0,0181$) aumentam em OG1, com o pico de calprotectina em OG3 ($P = 0,0002$). O aumento de ambas parece estar envolvido com a própria sinalização inflamatória mediada pela via JAK/STAT3, em que ocorre a liberação de mediadores inflamatórios pela ativação do NF κ B (PENG et al., 2015).

Já na região de lamela abaxial o STAT3 apresenta seu pico em OG3 ($p = 0,0092$) enquanto a calprotectina aumenta em OG1 ($P = 0,0444$) atingindo seu pico em OG3 ($P = 0,0016$). Segundo Faleiros et al. (2011b), a expressão de quimiocinas no tecido lamelar ocorre antes mesmo da chegada de leucócitos, com o propósito de atraí-los para a região inflamada. Deste modo, o pico de calprotectina na região de lamela axial e abaxial nos leva a crer que tanto a migração dos leucócitos, quanto a inflamação tecidual antecedem a fosforilação de STAT3 em OG3, pela correlação positiva de Cal axi x p-STAT3 aba ($r = 0,64$) e Cal aba x p-STAT3 aba ($r = 0,57$) (GOMES et al., 2009; LEISE, 2018).

Ao comparar a calprotectina na derme sublamelar com p-RPS6 (ser240/244) na região de sublamela, axial e abaxial, estas apresentaram uma correlação moderada ($r = 0,54$; $r = 0,67$; $r = 0,51$, respectivamente). No entanto, o pico de p-RPS6 foi mais precoce, ocorrendo em OG1. Deste modo, a correlação entre Cal Sub x p-RPS6 Axi foi mais forte, embora classificada como moderada. A dinâmica de sinalização para a fosforilação da RPS6 pode ser influenciada por uma grande variedade de estímulos, desde sinalização inflamatória até fatores de crescimento, liberados pelas células teciduais (TOLOMEO; CASCIO, 2021; WANG et al., 2022). Como a fosforilação da RPS6 é dependente da ativação do mTORC1, esse é um importante controlador de quimiocinas regulando o tráfico de células do sistema imune (SINCLEAR et al., 2008).

Os resultados sugerem que a fosforilação das proteínas STAT3 e RPS6 apresentam uma dinâmica temporal semelhante nos estágios diferentes de desenvolvimento da lamina em equinos. Uma percepção inédita na lamina de origem inflamatória. Embora a dinâmica das proteínas ocorra de forma semelhante na derme sublamelar, na região de lamela axial a p-STAT3 aumenta sua expressão no OG1 (36h após indução). Fato que só ocorre em OG3 para p-RPS6.

Na região de lamela abaxial, tanto p-STAT3 quanto RPS6 atingem o pico só em OG3 (60-73h). Ao analisar a p-RPS6, a proteína inicia seu aumento na região de derme sublamelar no tempo 36h, ao passo que na lamela axial, o pico é atingido somente em OG3, sendo sustentado na região de lamela abaxial. No entanto, todas as correlações obtidas entre essas proteínas foram de fracas a leves. A proteína STAT3 e a RPS6 são proteínas diferentes que desempenham funções distintas nas células, mas com propósitos semelhantes (BANERJEE; RESAT, 2016; MOK et al., 2012). Acredita-se que a STAT3 pode levar a sinalização da RPS6 pela ativação da via de sinalização do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), já que o processo de fosforilação dessas proteínas é altamente regulado e podem ocorrer em diferentes condições celulares. Deste modo, tanto a STAT3 quanto a RPS6 são alvos comuns de diversas vias de sinalização intracelular, onde ambas compartilham dos mesmos fatores que ativam suas cascatas de eventos (DAMASCENO et al., 2020; KOTELEVETS; CHASTRE, 2020). No entanto, é possível que essas proteínas sejam fosforiladas simultaneamente na região de derme sublamelar e região de lamela axial.

Há evidências que sugerem que a sinalização do STAT3 pode modular a atividade do mTOR, especificamente via fosforilação do STAT3. Quando o STAT3 é fosforilado na tirosina 705, ele pode ativar genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular (YO et al., 2021), mas quando fosforilado em serina 727, também pode aumentar a sinalização do mTOR por vários mecanismos (YOKOGAMI et al., 2000; AGGARWAL et al., 2009).

Estudos demonstram que as células inflamadas sofrem uma reprogramação metabólica dinâmica para suportar as novas necessidades bioenergéticas e biossintéticas. Essa reprogramação ocorre pela ação de mTORC1 e do fator induzível por hipoxia 1 α (HIF1 α), que possuem um papel central no controle da ativação do sistema imune e suas funções (O'NEILL et al., 2016; BUCK et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016).

Um mecanismo pelo qual a fosforilação do STAT3 aumenta a sinalização do mTOR é aumentando a expressão do próprio mTOR. Estudos têm mostrado que o STAT3 ativado pode aumentar a expressão do mTOR em diversos tipos de células, levando a um aumento na atividade do mTOR e na sinalização a jusante (ZHANG et al., 2020).

Além de aumentar a expressão do mTOR, a fosforilação do STAT3 também pode ativar diretamente a sinalização do mTOR, inibindo o regulador negativo do mTOR, o complexo de esclerose tuberosa (TSC) (DAMASCENO et al., 2020; LI et al., 1997; ZHANG et al., 2020). O TSC inibe a sinalização do mTOR bloqueando a atividade da pequena GTPase Rheb, que é

necessária para a ativação do mTOR (LEE et al., 2007; POPOVA; JÜCKER, 2021). No entanto, quando o STAT3 é fosforilado, ele pode se ligar diretamente e inibir o TSC, levando a um aumento na atividade da Rheb e subsequente ativação do mTOR (SHAH et al., 2004). No geral, a fosforilação do STAT3 pode aumentar a sinalização do mTOR por mecanismos indiretos, levando a um aumento no crescimento e proliferação celular (PORRAS et al., 2004; LEE et al., 2007).

4. CONCLUSÃO

Os resultados agregam evidências à teoria de que a inflamação promovida pelo aumento das concentrações da citocina IL-6 (desencadeadora de p-STAT3) e da infiltração leucocitária (fonte e indutora de calprotectina) no tecido lamelar está diretamente associada à ativação da via mTOR, que justifica alterações funcionais e histológicas da laminite como desprendimento dos queratinócitos da membrana basal e falha do aparato suspensor da falange distal. Tomados em conjunto, tais achados corroboram o potencial de componentes das vias celulares mTOR/RPS6 e IL-6/gp130 como potenciais alvos terapêuticos na laminite relacionada à sepse em equinos.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B.B., KUNNUMAKKARA, A.B., HARIKUMAR, K.B., GUPTA, S.R., THARAKAN, S.T., KOCA, C., DEY, S., SUNG, B. Signal Transducer and Activator of Transcription-3, Inflammation, and Cancer. How Intimate Is the Relationship? *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1171, p.59–76, 2009.
- ALMEIDA, L., M. LOCHNER, L. BEROD, AND T. SPARWASSER. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin. Im- munol.* v.28, p.514–524, 2016.
- ASPLIN, K.E., SILLENCE, M.N., POLLITT, C.C., MCGOWAN, C.M. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *The Veterinary Journal.* v.174 p.530–535, 2007.
- BAILEY, S.R., ADAIR, H.S., REINEMEYER, C.R., MORGAN, S.J., BROOKS, A.C., LONGHOFER, S.L., ELLIOTT, J. Plasma concentrations of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose-induced laminitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.129, p.163- 173, 2009.
- BANERJEE, K., RESAT, H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int. Journal Cancer.* v.138, p.2570–2578, 2016.
- BARTON, M.H., PERONI, J.F. System Inflammatory Response. In: AUER, J.A., STICK, J.A. KÜMMERLE, J.M., PRANGE, T. (Eds.). *Equine Surgery*, 5. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2019, p.14-27.
- BELKNAP, J.K. Laminitis: an Overview. In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). *Equine Laminitis*. 1. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2017. p. 11-12.
- BERTUZZI, R.C.M. Estimativa dos metabolismos anaeróbios no Déficit Máximo Acumulado de Oxigênio. Orientador: Maria Augusta Peduti Kiss Dal Molin. 2008. 157p. Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- BLIKSLAGER, A.T. Small Intestinal Function. In: BLIKSLAGER, A.T.; WHITE, N.A.; MOORE, J.N.; MAIR, T.S. (Eds.). 3. ed Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2017. p. 27–40.
- BOLAÑOS, J.P., ALMEIDA, A., MONCADA, S. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in Biochemical Sciences*, v.35, n.3, p.145-149, 2009.
- BROMBERG, J., WANG, T.W. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 Complete the Link. *Cancer Cell.* v.15, p.79-80, 2009.
- BROOKS, G. A.; DUBOUCHUD, H.; BROWN, M., SICURELLO, J.P., BUTZ, C.E. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Anais. 1999. v. 96, n. 3, p. 1129-1134.
- BUCK, M.D., D. O’SULLIVAN, AND E.L. PEARCE. T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* v.212, p.1345–1360, 2015.
- BUDAK, M.T., ORSINI, J.A., POLLITT, C.C., RUBINSTEIN, N.A. Gene expression in the lamellar dermis–epidermis during the developmental phase of carbohydrate overload-induced laminitis in the horse. *Veterinary Immunology and immunopathology.* v.131, p.86-96, 2009.
- CATUNDA, A.P.N., ALVES, G.E.S., PAES LEME, F.O., CARVALHO, A.M., LEISE, B.S., JOHNSON, P.J., FALEIROS, R.R. Apoptosis in epithelial cells and its correlation with

leukocyte accumulation in lamellar tissue from horses subjected to experimental sepsis-associated laminitis. *Research in Veterinary Science*, v.136, p.318-323, 2021.

CHAISUPARAT, R., ROJANAWATSIRIVEJ, S., YODSANGA, S. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation is Associated with Epithelial Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Pathology and Oncology Research*, v.19, p.189–193, 2013.

CHUNG, J., UCHIDA, E., GRAMMER, T.C., BLENIS, J. STAT3 Serine Phosphorylation by ERK-Dependent and -Independent Pathways Negatively Modulates Its Tyrosine Phosphorylation. *Molecular And Cellular Biology*, v.17, n.11, p.6508–6516, 1997.

CIBRIAN, D., DE LA FUENTE, H., SANCHEZ-MADRID, F. Metabolic pathways that control skin homeostasis and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*. v.26, p.975–986, 2020.

COHEN, N.D.; AND WOODS, A.M. Characteristics and risk factors for failure of horses with acute diarrhea to survive: 122 cases (1990–1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 214, p. 382–390, 1999.

COLEMAN, M.; COHEN, N. American Association of Equine Practitioners Foundation Case-Control Study of Pasture- and Endocrinopathy-Associated Laminitis. AAEP proceedings. v.58, p.315-316, 2012.

COTA, L.O. Resposta Inflamatória Sistêmica, Disfunção Orgânica e Laminite Induzidas por Oligofrutose em Equinos Suplementados ou não com *Lithothamnium Muelleri*. Orientador: Rafael Resende Faleiros. 2021. 91p. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

DE LAAT, M.A., VAN EPS, A.W., MCGOWAN, C.M., SILLENCE, M.N. AND POLLITT, C.C. Equine laminitis: comparative histopathology 48 hours after experimental induction with insulin or alimentary oligofructose in standardbred horses. *J. Comp. Pathol.* v.145, p.399-409, 2011.

DERN, K., BURNS, T.A., WATTS, M.R., VAN EPS, A.W., BELKNAP, J.K. Influence of digital hypothermia on lamellar events related to IL-6/ gp130 signalling in equine sepsis-related laminitis. *Equine Veterinary Journal* v.52, p.441–448, 2020.

DING, X., BLOCH, W., IDEN, S., RUEGG, M. A., HALL, M. N., LEPTIN, M., PARTRIDGE, L., EMING, S.A. mTORC1 and mTORC2 regulate skin morphogenesis and epidermal barrier formation. *Nature Communications*. v.7, 13226. 2016.

EADES, S.C. Overview of what we know about the pathophysiology of laminitis. *Journ. Equine Vet. Science*. v. 30, n. 2. p. 83 – 86, 2010.

FALEIROS, R. R.; LEISE, B. S.; WATTS, M. *et al.* Veterinary Immunology and Immunopathology Laminar chemokine mRNA concentrations in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 144, n. 1–2, p. 45– 51, 2011b.

FALEIROS, R. R.; NUOVO, G. J.; BELKNAP, J. K. Calprotectin in Myeloid and Epithelial Cells of Laminae from Horses with Black Walnut Extract-Induced Laminitis. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 23, p. 174–181, 2009.

FALEIROS, R. R.; NUOVO, G. J.; FLECHTNER, A. D. *et al.* Presence of mononuclear cells in normal and affected laminae from the black walnut extract model of laminitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 43, p. 45–53, 2011a.

- FALEIROS, R.R.; BELKNAP, J.K. Leukocytes and Inflammatory Signaling in Laminitis: Leukocytes. In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). *Equine Laminitis*. 1. ed. Ames, Iowa: *John Wiley & Sons*, 2017. p. 91–101.
- FONTAINE, G. L.; BELKNAP, J. K.; ALLEN, D. *et al.* Expression of interleukin-1 β in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n. 5, p. 714–720, 2000.
- FORBE, L.R.; MILNER, J.; HADDAD, E. STAT3: A year in Review. *Current Opinion in Hematology*, v. 23, n.1, p.23-27, 2016.
- FRENCH, K. R.; POLLITT, C. C. Equine laminitis: glucose deprivation and MMP activation induce dermo-epidermal separation in vitro. *Equine Veterinary Journal*, v. 36, p. 261–266, 2004.
- FROEHLICH, D.J. Quo vadis eohippus? The systematics and taxonomy of the early eocene equids (Perissodactyla). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v.134, p.141-256, 2002.
- GARDNER, A.K., VAN EPS, A.W., WATTS, M.R., BURNS, T.A., BELKNAP, J.K. A novel model to assess lamellar signaling relevant to preferential weight bearing in the horse. *The Vet Journal*. V.221, p. 62-67, 2017
- GARNER, H.E., et al. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. *American Journal Veterinary Research*, v.36, n.4, p.441-444, 1975.
- GOMES, M.A.M, CAVALCANTE, N.M.N, BISPO, I.G.A. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. *Rev. SOCERJ*. V.22, n.6, p.398-406, 2009.
- GOMEZ-PINILLO, A., FERRARI, A.C. mTor signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer therapy. *Hematol Oncol Clin N Am*. v.26 p.483-505, 2012.
- GRESSNER, A. M., WOOL, I. G. The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. *J. Biol. Chem*. v.249, p.6917–6925, 1977.
- HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v.144, n.5, p.646-674, 2011.
- HARDIE, D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy, *Nature Review*, Mol. Cell Biol. v.8, p. 774–785, 2007.
- HIRANO. T., TAGA, T., YAMASAKI, K., MATSUDA, T., YASUKAUA, K., HIRATA, Y., YAWATA, H., TANABE, O., AKIRA, S., KISHIMOTO, T. Molecular cloning of the cDNAs for interleukin-6 / B cell stimulatory factor 2 and its receptor. *Annals New York Academy of Sciences*. v.557, p.167-178, 1989.
- HOOD, D. M. Laminitis in the horse. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v.15, p. 287– 294, 1999
- JOHNSON, P.J., MESSER, N.T., SLIGHT, S.H., WIEDMEYER, C., BUFF, P., GANJAM, V.K., Endocrinopathic laminitis in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice* 3, 45–56, 2004.
- JOHNSON, S.C., RABINOVITCH, P.S., KAEBERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, v.493, p.338-345, 2013.
- KABAT, D. Phosphorylation of ribosomal proteins in rabbit reticulocytes. Characterization and regulatory aspects. *Biochemistry*, v.9, p.4160–4175, 1970.

- KARIN, K. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, v.18, p.6867-6874, 1999.
- KISHIMOTO, M., KOMINE, M., SASHIKAWA-KIMURA, M., ANSARY, T.M., KAMIYA, K., SUGAI, J., MIENO, M., KAWATA, H., SEKIMOTO, R., FUKUSHIMA, R. OHTSUKI, M. STAT3 Activation in Psoriasis and Cancers. *Diagnostics*. v.11, p.1903, 2021.
- KOSTER, M. I., AND ROOP, D. R. Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. v.23, p.93–113, 2007.
- KOTELEVETS, L., CHASTRE, E. Rac1 Signaling: From Intestinal Homeostasis to Colorectal Cancer Metastasis. *Cancers Review*, v.12, n. 665, p.1-43, 2020
- LANE, H. E., BURNS, T. A., HEGEDUS, O. C., WATTS, M.R., WEBER, P.S., WOLTMAN, K. A., GEOR, R. J., MCCUTCHEON, L. J., EADES, S.C., MATHES, L. E., BELKNAP, J. K. Lamellar events related to insulin-like growth factor-1 receptor signaling in two models relevant to endocrinopathic laminitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 49, n. 5, p. 643–654, 2017.
- LAPLANTE, M. SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* v.149, p.274–293, 2012.
- LASKOSKI, L.M., VALADÃO, C.A.A., VASCONCELOS, R.O., SOUZA, A.H., FALEIROS, R.R., AMORIM, R.L. Morphological abnormalities and apoptosis in lamellar tissue of equines after intestinal obstruction and treatment with hydrocortisone. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v.62, n.6, p.1331-1339, 2010
- LEACH, D.H. *The Structure and Function of The Equine Hoof Wall*. 1980. 369f. Thesis (Doctor of Philosophy in Veterinary Anatomy). Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon
- LEE, D.F., KUO, H.P., CHEN, C.T., HSU, J.M., CHOU, C.K., WEI, Y., SUN, H.L., LI, L.Y., PING, B., HUANG, W.C., HE, X., HUNG, J.Y.M, LAI, C.C., DING, Q., SU, J.L., YANG, J.Y., SAHIN, A.A., HORTOBAGYI, G.N., TSAI, F.J., TSAI, C.H., HUNG, M.C. IKK β Suppression of TSC1 Links Inflammation and Tumor Angiogenesis via the mTOR Pathway. *Cell*, v.130, p.440-455, 2007.
- LEISE, B. The role of neutrophils in equine laminitis. *Cell and Tissue Research*, v. 371, p. 541–550, 2018.
- LEISE, B.S. Leukocytes and inflammatory Signaling in Laminitis: Inflammatory Signaling. In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). *Equine Laminitis*. 1. ed. Ames, Iowa: *John Wiley & Sons*, 2017. p. 102–114.
- LEISE, B.S. The role of neutrophils in equine laminitis. *Cell and Tissue Research*, v. 371, p. 541– 550, 2018.
- LEISE, B.S., FALEIROS, R.R., WATTS, M., JOHNSON, P.J., BLACK, S.J., BELKNAP, J.K. Laminar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis, *Equine Veterinary Journal*, v.43, n.1, p.54-61, 2011.
- LEISE, B.S., WATTS, M., TANHOFF, E., JOHNSON, P.J., BLACK, S.J., BELKNAP, J.K. Laminar Regulation of STAT1 and STAT3 in Black Walnut Extract and Carbohydrate Overload Induced Models of Laminitis. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v.26, p.996-1004, 2012.
- LI, J., YEN, C., LIAW, D., PODSYPANINA, K., BOSE, S., WANG, S.I., PUC, J., MILIAREISIS, C., RODGERS, L., MCCOMBIE, R., BIGNER, S.H., GIOVANELLA, B.C., ITTMANN, M., TYCKO, B., HIBSHOOSH, H., WIGLER, M.H., PARSONS, R. PTEN, a

putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. v.275, p.1943–1947, 1997.

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

LOHMANN, K., VANDENPLAS, M.L., BARTON, M.H., BRYANT, C.E., MOORE, J.N. The equine TLR4/MD-2 complex mediates recognition of lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* as an agonist. *Journal of Endotoxin Research*, v.13, n.4, 2007.

MACKIEWICZ, A., SCHOOLTINK, H., HEINRICH, P.C., *et al.*: Complex of soluble human IL- 6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *Journal Immunology*, v.149, n.6, p.2021–2027, 1992.

MARTIN, K. A., SCHALM, S. S., ROMANELLI, A., KEON, K. L., AND BLENIS, J. Ribosomal S6 kinase 2 inhibition by a potent C-terminal repressor domain is relieved by mitogen- activated protein-extracellular signal-regulated kinase kinase-regulated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* v.276, p.7892–7898, 2001.

MASUI, K., CAVENEY, W.K., MISHEL, P.S. mTORC2 in the center of cancer metabolic reprogramming. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v.25, n.7, p.364-373, 2014.

MEYUHAS, O. Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *Int Rev Cell Mol Biol.*, v. 268, p.268:1–37, 2008.

MIAO, J., LIU, L., HUANG, J. Interleukin-6-induced epithelial-mesenchymal transition through signal transducer and activator of transcription 3 in human cervical carcinoma. *International Journal of Oncology*, v.45, p.165-176, 2014. MINNICK, P.D., *et al.* The induction of equine laminitis with an aqueous extraction of the heartwood of black walnut (*Juglans nigra*). *Veterinary and Human Toxicology*, v. 29, n.3, p.230-233, 1987.

MOGG, K.C., POLLITT, C.C. Hoof and distal limb surface temperature in the normal pony under constant and changing ambient temperatures. *Equine Vet. J.*, v.24, p.134–139, 1992.

MOK, K.W., MRUK, D.D., SILVESTRINI, B., CHENG, C.Y. rpS6 Regulates Blood-Testis Barrier Dynamics By Affecting F-Actin Organization and Protein Recruitment. *Endocrinology*, v.153, n.10, p.5036–5048, 2012.

MOORE, J.N.; VANDENPLAS, M.L. Is it the Systemic Inflammatory Response Syndrome or Endotoxemia in Horses with Colic? *Veterinary Clinics: Equine Practice*, v.30, n.2 p.337-351, 2014.

MUECKLER, M., THORENS, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.*, v.34, p.121–138, 2013.

MUNOZ, E.; ARGUELLES, D.; ARESTE, L.; MIGUEL, L. S.; PRADES, M. Retrospective analysis of exploratory laparotomies in 192 Andalusian and 276 horses of other breeds. *Veterinary Record*, v. 162, p. 303–306, 2008.

NOSCHKA, E.; VANDENPLAS, M. L.; HURLEY, D. J. *et al.* Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 129, p. 242–253, 2009.

O’NEILL, L.A.J., R.J. KISHTON, AND J. RATHMELL. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* v.16, p. 553–565, 2016.

OBEL, N. (1948) Studies of the Histopathology of Acute Laminitis, PhD thesis, Almgvist and Wilscells Bottrykeri Ab Uppsala.

- PARKS, A.H. Anatomy and Function of The Equine Digit. In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). *Equine Laminitis*. 1. ed. Ames, Iowa: *John Wiley & Sons*, 2017. p. 13–21.
- PASS, M.A., POLLITT, S. AND POLLITT, C.C. Decreased glucose metabolism causes separation of hoof lamellae *in vitro*: could this be a trigger for laminitis? *Equine vet. J., Suppl.* v.26, p.133-138, 1998.
- PENDE, M., UM, S.H., MIEULET, V., STICKER, M., GOSS, V.L., MESTAN, J., MUELLER, M., FUMAGALLI, S., KOZMA, S.C., THOMAS, G. S6K1¹/S6K2¹ mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5⁰-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol. Cell Biol.* v.24, p.3112–31124, 2004.
- PENG, J., TAO, X., LI, R., HU, J., RUAN, J., WANG, R., YANG, M., YANG, R., DONG, X., CHEN, S., XU, A., YUAN, S. Novel Toll/IL-1 Receptor Homologous Region Adaptors Act as Negative Regulators in Amphioxus TLR Signaling. *The Journal of Immunology*, v.195, n.7, p.3110-3118, 2015.
- POLLITT, C.C. Anatomy and Physiology of the Inner Hoof Wall. *Clin. Tech. Equine Pract.* v.3, p.3-21, 2004.
- POLLITT, C.C. Clinical anatomy and physiology of the normal equine foot. *Equine vet. Educ.* v.4, p.219-224, 1992.
- POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. *American Association of Equine Practitioners Proceedings*, v.45, p.188-192, 1999.
- POLLITT, C.C. Lamellar Function at the Cellular level. In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). *Equine Laminitis*. 1. ed. Ames, Iowa: *John Wiley & Sons*, 2017. p. 22–38.
- POLLITT, C.C. The Anatomy and Physiology of the Suspensory Apparatus of the Distal Phalanx. *Vet Clin Equine*, v.26, p.29–49, 2010.
- POLLITT, C.C. *The Illustrated Horse's Foot: A Comprehensive Guide*. 1. Ed. St. Louis, Missouri, 2016. p.177-222
- POPOVA, N.V., JÜCKER, M. The Role of mTOR Signaling as a Therapeutic Target in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, v.22, 1743, 2021.
- PORRAS, A., ZULUAGA, S., BLACK, E., VALLADARES, A., ALVAREZ, A.M., AMBROSINO, C., BENITO, M., NEBRED, A.R. p38 α Mitogen-activated Protein Kinase Sensitizes Cells to Apoptosis Induced by Different Stimuli. *Molecular Biology of the Cell*, v.15, p.922–933, 2004.
- QIN, J.J., YAN, L., ZHANG, J., ZHANG, W.Z. STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v.38, n.195, p.1-16, 2019
- REBIERE, P. Evaluation of low-molecular-weight heparin for the prevention of equine laminitis after colic surgery. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 19, p. 113–119, 2009.
- ROLFE, D.F.S., BROWN, G.C. Cellular Energy Utilization and Molecular Origin of Standard Metabolic Rate in Mammals. *Physiology Review*. v.77, n.3, p.731-758, 1997.
- ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000 Research*, v.9, p.1-9, 2020.

- ROSE-JOHN, S. Local and Systemic Effects of Interleukin-6 (IL-6) in inflammation and Cancer. *FEBS Letters*, v.596, p.557-566, 2022.
- ROSENMEIER, J.G., STRATHE, A.B., ANDERSEN, P.H. Evaluation of coronary band temperatures in healthy horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.73, p.719–723, 2012.
- SANO, S., CHAN, K.S., CARBAJAL, S., CLIFFORD, J., PEAVEY, M., KIGUCHI, K., ITAMI, S., NICKOLOFF, B.J., DIGIOVANNI, J. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nature Medicine*. v.11, n.1, p.43-49, 2005.
- SAXTON, R. A., SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, v.168, p.960–976, 2017.
- SHELLER, J., CHALARIS, A., SCHMIDT-ARRAS, D., et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, v.1813, p.878–888, 2011.
- SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* v.8, p.93–151, 2006.
- SCHREIBER, S., ADEN, K., BERNARDES, J.P. CONRAD, C., TRAN, F., HÖPER, H., VOLK, V. MISHRA, N., BLASE, J.I., NIKOLAUS, S., BETHGE, J., KÜHBACHER, T., RÖCKEN, C., CHEN, M., COTTINGHAM, I., PETRI, N., RASMUSSEN, B.B., LOKAU, J., LENK, L., GARBERS, C., FEUERHAKE, F., ROSE-JOHN, S., WAETZIG, G.H., Rosenstiel, P. Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, v.160, p. 2354–2366, 2021.
- SCHURR, A., PAYNE, R.S., MILLER, J.J., TSENG, M.T. Preischemic Hyperglycemia-Aggravated Damage: Evidence That Lactate Utilization Is Beneficial and Glucose-Induced Corticosterone Release Is Detrimental. *Journal of Neuroscience Research*, v. 789, n. 66, p. 782–789, 2001.
- SHAH, O.J., WANG, Z., HUNTER, T. Inappropriate activation of the TSC/ Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Current Biology*, v.14, p.1650–1656, 2004.
- SHEATS, M.K. A Comparative Review of Equine SIRS, Sepsis, and Neutrophils. *Frontiers in Veterinary Science*. v.6, p. 1-19, 2019.
- SHEATS, M.K. A Comparative Review of Equine SIRS, Sepsis, and Neutrophils. *Frontiers in Veterinary Science*. v.6, p. 1-19, 2019.
- SINCLAIR, L. V., D. FINLAY, C. FEIJOO, G. H. CORNISH, A. GRAY, A. AGER, K. OKKENHAUG, T. J. HAGENBEEK, H. SPITS, D. A. CANTRELL. Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat. Immunol.*v.9, p.513-521, 2008.
- SPADETO, O.J. Leucoaférese terapêutica na laminite aguda induzida por oligofrutose em equinos. Orientador: Rafael Resende Faleiros. 2017. 97p. Tese (Doutorado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
- STANFEL, M. N., SHAMIEH, L. S., KAEBERLEIN, M. KENNEDY, B. K. The TOR pathway comes of age. *Biochim. Biophys. Acta* v.1790, p.1067–1074, 2009.
- TADROS, E.M.; FRANK, N.; HOROHOV, D. W. Inflammatory cytokine gene expression in blood during the development of oligofrutose-induced laminitis in horses. *J Equine Vet. Sc.* v. 33, p. 802-808, 2013.

TOLOMEO, M., CASCIO, A. The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, v.22, n.603, 2021.

TURNER, J.F., TURNER, D.H. The Regulation of Glycolysis and Pentose Phosphate Pathway. In: Stumpf, P.K. (Eds.). *Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise*. 1. ed. Waltham, Massachusetts: *Academic Press*, 1980. p. 279–316.

VAN EPS, A.W. General Clinical Aspects of the Laminitis Case. In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). *Equine Laminitis*. 1. ed. Ames, Iowa: *John Wiley & Sons*, 2017. p. 183- 190.

VAN EPS, A.W.; POLLITT, C.C. Equine laminitis induced with oligofructose. *Equine Veterinary Journal*, v.38, n.3, p.203-208, 2006.

VINKEMEIER, U., COHEN, S.L., MOAREFI, I., CHAIT, B.T., KURIYAN, J., DARNELL, J.E. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *The EMBO Journal*, v.15, n.20, p.5616–5626, 1996.

VISSER, M.B., POLLITT, C.C. Lamellar leukocyte infiltration and involvement of IL-6 during oligofructose-induced equine laminitis development. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.144, p.120-128, 2011.

VOLAREVIC, S., STEWART, M. J., LEDERMANN, B., ZILBERMAN, F., TERRACCIANO, L., MONTINI, E., GROMPE, M., KOZMA, S. C., AND THOMAS, G. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* v.288, p.2045–2047, 2000.

WAGNER, I.P.; HEYMARING, H. Historical Perspective on Laminitis. *Veterinary clinics of north america: equine practice*, v.15, n.2, p.295-309, 1999.

WANG, J., BAIPING CUI, B., CHEN, Z., DING, X. The regulation of skin homeostasis, repair and the pathogenesis of skin diseases by spatiotemporal activation of epidermal mTOR signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022, 10:950973. doi: 10.3389/fcell.2022.950973

WANG, J., CUI, B., CHEN, Z., DING, X. The regulation of skin homeostasis, repair and the pathogenesis of skin diseases by spatiotemporal activation of epidermal mTOR signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022. doi: 10.3389/fcell.2022.950973

WANG, X., CROWE, P.J., GOLDSTEIN, D., YANG, J. STAT3 inhibition, a novel approach to enhancing targeted therapy in human cancers (Review). *International journal of oncology*, v.41, p.1181-1191, 2012.

WATTLE, O., POLLITT, C. C. Lamellar Metabolism. *Clinica Techniques in Equine Practice*, p. 22–33, 2004.

WEI, S., FAN, Q., YANG, L., ZHANG, X., MA, Y., ZONG, Z., HUA, X., SU, D., SUN, H., LI, H., LIU, Z. Promotion of glycolysis by HOTAIR through GLUT1 upregulation via mTOR signaling. *Oncology Reports*, v.38, p.1902-1908, 2017.

XIONG, H., HONG, J., DU, W., LIN, Y., REN, L., WANG, Y., SU, W., WANG, J., CUI, Y., WANG, Z., FANG, J. Roles of STAT3 and ZEB1 Proteins in E-cadherin Down-regulation and Human Colorectal Cancer Epithelial-Mesenchymal Transition. *The Journal Of Biological Chemistry*, v.287, n.8, p.5819 –5832, 2012.

YO, Z., WANG, D., TANG, Y. PKM2 promotes cell metastasis and inhibits autophagy via the JAK/ STAT3 pathway in hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.476, p.2001–2010, 2021.

YOKOGAMI, K., WAKISAKA, S., AVRUCH, J., REEVES, S.A. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current Biology*, [v.10, n.1](#), p.47-50, 2000.

ZAMBRANO, A., MOLT, M., URIBE, E., SALAS, M. Glut 1 in Cancer Cells and the Inhibitory Action of Resveratrol as A Potential Therapeutic Strategy. *International Journal of Molecular Sciences*, v.23, p.1-20, 2019.

ZHANGA, Z.H., LIA, M.L., WANGA, Z., ZUOA, H.X., WANGA, J.Y., XINGA, Y., JINA, C., XUA, G., PIAOA, L., PIAOB, H., MAA, J., JIN, X. Convallatoxin promotes apoptosis and inhibits proliferation and angiogenesis through crosstalk between JAK2/STAT3 (T705) and mTOR/ STAT3 (S727) signaling pathways in colorectal cancer. *Phytomedicine*, v.68, 2020.