

Leonardo Rodrigues de Lima

**REPARIXINA, UM ANTAGONISTA DE CXCR1 E CXCR2, NA LAMINITE  
EXPERIMENTAL DE EQUINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção do título de Doutor na área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

Orientador: Prof. Rafael Resende Faleiros.

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2013



Tese defendida e aprovada em 01 de abril de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:

---

Prof. Rafael Resende Faleiros (Orientador)

---

Professora Adriana Helena de Souza

---

Professora Eliane Gonçalves de Melo

---

Professor Mauro Martins Teixeira

---

Professor Carlos Augusto Araújo Valadão

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa obra a minha família: Primeiro aos meus pais por que me deram tudo que eu precisei para chegar até aqui. Aos meus irmãos Ricardo, Eduardo e Carolina pelo amor que nos mantem unidos. À minha querida esposa Helen por me apoiar sempre e manter a retaguarda enquanto avançamos juntos. Aos meus amados filhos Enzo e Luca por se tornarem a razão de seguir progredindo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me inspirar e me dar os instrumentos materiais e intelectuais necessários.

Ao meu Orientador Professor Rafael Resende Faleiros pelo carinho e sabedoria com que conduz seus orientados. Pelo exemplo de responsabilidade científica e, sobretudo de conduta humana. Minha eterna gratidão.

A minha colega de Doutorado e amiga Heloísa Mendes Falcão que me ajudou incondicionalmente e sem seu apoio nada seria possível.

Ao Professor e co-orientador Geraldo Eleno Silveira Alves por me trazer a essa escola e abrir essa inestimável oportunidade.

Ao professor Fernando Queiroz de Almeida pela sua valorosa contribuição na pré-defesa desse trabalho.

Ao professor Fernando Antônio Bretas Viana pelos preciosos ensinamentos na oftalmologia veterinária.

À professora Fabíola de Oliveira Paes Leme por nos ceder os serviços do Laboratório de Patologia Clínica, além de sua contribuição para minha qualificação.

Ao professor Frederico Soriani pela sua importante contribuição com as análises de PCR e com minha qualificação.

Ao professor Roberto Maurício Carvalho Guedes pela sua participação na qualificação.

Ao professor Mauro Martins Teixeira pelo compartilhamento do fármaco usado nesse trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Bruno Zambelli, Ingrid Rios Lima, Bruno Andrade, Fabiane Cassou, Ramon Aranzales, pelos ensinamentos compartilhados e pela amizade.

Aos colegas Leandro Meirelles, Joana Volpe, Jessica F. Magalhães, Ludmila Markowitz e Carolina B. Cavalcanti pela preciosa ajuda durante o experimento.

Aos amigos Juarez e Pitágoras da Fazenda Escola de Pedro Leopoldo, por sua solicitude e apoio com os animais do experimento. Aos funcionários Luiz, Carlos e Tião pelo apoio aos meus trabalhos.

A equipe do Hospital Veterinário Estrada Real por garantirem nosso sustento enquanto nos dedicamos a esse trabalho. Obrigado Helen, Taciana, Vivian, Polyana, Leandro, Joana, Willane, Sheila, Vanesca, Rosângela e Haroldo. A todos os funcionários e estagiários que contribuem com nosso trabalho.

Aos zelosos Irmãos espirituais que me orientam silenciosamente a caminho do progresso.

Aos animais experimentais. Sem saber de onde vieram ou mesmo seus nomes, me lembrarei sempre de cada um e de suas dores, na esperança que seus sofrimentos não tenham sido em vão.

---

**SUMÁRIO**

---

<b>CAPÍTULO 1.</b>	Laminite equina: revisão de literatura	11
	Introdução	11
	Microestrutura lamelar	11
	Eventos microestruturais na laminite	12
	Fisiopatologia da laminite	13
	Eventos vasculares	14
	Eventos enzimáticos	14
	Eventos metabólicos	15
	Eventos inflamatórios	16
	Quimiocinas	18
	Quimiocinas cxc e laminite	19
	Antagonismo de cxcr1/2 como alvo terapêutico	20
	Indução experimental de laminite	21
	Referências	22
<b>CAPÍTULO 2</b>	Sinais clínicos e hematológicos de equinos submetidos ao modelo de laminite induzida por oligofrutose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2	29
	Resumo	29
	Abstract	29
	Introdução	30
	Material e Métodos	31
	Resultados	32
	Discussão	35
	Conclusão	37
	Referências	37
<b>CAPÍTULO 3</b>	Alterações histológicas e imunohistoquímicas das lamelas do casco de equinos submetidos ao modelo de laminite induzida por oligofrutose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2	41
	Resumo	41
	Abstract	41
	Introdução	42
	Material e Métodos	43
	Resultados	45
	Discussão	47
	Conclusão	49
	Referências	50
<b>CAPÍTULO 4</b>	Efeitos de um agente antagonista de receptores CXCR1 e CXCR2 sobre a expressão de IL1-beta, IL-6 e CXCL1 nas lamelas do casco de equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose	52
	Resumo	52
	Abstract	52
	Introdução	53
	Material e Métodos	54

Resultados	56
Discussão	56
Conclusão	57
Referências	58
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>62</b>

---

### LISTA DE FIGURAS

---

<b>CAPÍTULO 1</b>	Figura 1– Parte interna da parede do casco demonstrando as lamelas epidérmicas primárias (PEL) e as lamelas epidérmicas secundárias (SEL) (Pollit 2007b).	12
	Figura 2- Fotomicrografia de corte histológico das lamelas epidérmicas secundárias (SEL) normais demonstrando a membrana basal marcada em magenta.	12
	Figura 3- Fotomicrografia das lamelas secundárias demonstrando alterações histológicas de grau 1.	13
	Figura 4- Fotomicrografia das lamelas secundárias demonstrando alterações histológicas de grau 2.	13
	Figura 5 - Fotomicrografia das lamelas secundárias demonstrando alterações histológicas de grau 3.	13
	Figura 6- Estrutura química da reparixina.	20
<b>CAPÍTULO 2</b>	Figura 1. Variação na frequência cardíaca em equinos com laminite induzida por oligofrutose.	32
	Figura 2. Variação na temperatura retal em equinos com laminite induzida por oligofrutose .	33
	Fig 3. Variação no grau de claudicação segundo Obel (1948) em equinos com laminite induzida por oligofrutose	33
	Fig 4. Variação na leucometria em equinos com laminite induzida por oligofrutose	33
	Figura 5. Variação no hematócrito em equinos com laminite induzida por oligofrutose.	33
	Figura 6. Variação na contagem de hemácias totais e concentração de hemoglobina em equinos com laminite induzida por oligofrutose.	34
	Figura 6. Variação nos níveis de glicose em equinos com laminite induzida por oligofrutose .	34
	Figura 7. Variação nos níveis de creatinina e uréia em equinos com laminite induzida por oligofrutose.	34
	Figura 8. Variação nos níveis de ALT e Bilirrubina em equinos com laminite induzida por oligofrutose.	35
<b>CAPÍTULO 3</b>	Figura 1- Remoção do extrato córneo com furadeira e broca para obtenção de biópsia do casco.	44
	Figura 2- Uso do Punch acoplado a furadeira para remoção do tecido lamelar.	44
	Figura 3- Intensa hemorragia após a remoção das amostras de tecido lamelar.	45
	Figura 4- Remoção da amostra de tecido lamelar obtidas através do uso de	45

punch acoplado a uma furadeira.	
Figura 5- Amostras de tecido lamelar obtidas através do uso de punch acoplado a uma furadeira.	46
Figura 6 - Escore de alterações histológicas no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) e tratados ou não com reparixina .	46
Figura 7 – Fotomicrografia de lamela secundária apresentando escore 1.	46
Figura 8 – Fotomicrografia de lamela secundária apresentando escore 3	46
Figura 9- Escore de Calprotectina como marcador de lesão das células epiteliais no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) (p<0,05).	47
Figura 10- Escore 0 de Calprotectina no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg)	47
Figura 11- Escore 3 de Calprotectina no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg)	47

<b>CAPÍTULO 4</b>	Figura 1 –Expressão de IL-1 $\beta$ no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) e tratados (T) ou não (NT) com reparixina.	56
	Figura 2- Expressão de IL-6 no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) e tratados (T) ou não (NT) com reparixina.	56

---

#### LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 3</b>	Tabela 1. Escores de lesões microscópicas em amostras de tecido lamelar coradas com PAS	44
<b>CAPÍTULO 4</b>	Tabela 1 – Sequências de primers utilizados para PCR em tempo real	55

---

#### LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CXCR1</b>	Receptor 1 para quimiocinas da família CXC ERL +
<b>CXCR2</b>	Receptores 2 para quimiocinas da família CXC ERL +
<b>IL- 1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1
<b>IL- 6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>CXCL1</b>	Fator estimulador do crescimento de melanoma 1
<b>SEL</b>	Lamela epidérmica secundária
<b>PEL</b>	Lamela epidérmica primária
<b>SDL</b>	Lamela dérmica secundária
<b>ALT</b>	Alamino transferase
<b>AST</b>	Aspartato transferase
<b>GGT</b>	Gama glutamil transferase
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>T</b>	Tratados
<b>NT</b>	Não tratados
<b>PAS</b>	Coloração histológica de “Periodic Acid Schiff”

<b>RT-PCR</b>	Real time polimarese chain reaction
<b>gMB</b>	Membrana basal
<b>MMP</b>	metaloproteinase
<b>ADAMTS-4</b>	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs tipo 4
<b>SME</b>	Síndrome metabólica equina
<b>GLUT-4</b>	Transportador de glicose dependente de insulina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose de Tumoral Alfa
<b>SIRS</b>	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
<b>BWE</b>	Black Walnut Extract – extrato de noqueira preta
<b>PAMP</b>	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
<b>DAMP</b>	Padrões Moleculares Associados a Danos Teciduais
<b>ECM</b>	Matriz Extracelular
<b>ERL+</b>	tripéptido Glutamina-Leucina-Arginina positivo
<b>ELR-</b>	tripéptido Glutamina-Leucina-Arginina negativo
<b>CXC</b>	Família de quimiocina CXC
<b>CXCL5</b>	Proteína epitelial ativadora de neutrófilos 5
<b>CXCL6</b>	Peptídeo 2 quimiotáxico de granulócitos
<b>CXCL7</b>	Proteína epitelial ativadora de neutrófilos 7
<b>CXCL2</b>	Fator estimulador do crescimento de melanoma 2
<b>CXCL3</b>	Fator estimulador do crescimento de melanoma 3
<b>CXCL9</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
<b>CXCL10</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
<b>CXCL11</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
<b>CXCL13</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13
<b>GPCR</b>	Proteína G
<b>GTP</b>	Guanosine-5'-triphosphate
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinase da matrix tipo 9
<b>I/R</b>	Isquemia/Reperusão
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeos
<b>g/Kg p.v</b>	Gramas por quilo por peso vivo
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrômetro
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno Diamino Tetracético
<b>G</b>	Unidade de força gravitacional
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	Graus Celsius
<b>VG</b>	Volume Globular
<b>CK</b>	Creatina Kinase
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>P</b>	Grau de significância
<b>mg/kg</b>	Miligramas por quilo
<b>CXC ERL+</b>	Quimiocinas CXC glutamina-leucina-arginina positivas
<b>CETEA</b>	Comitê de Ética sobre Experimentação Animal
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>n</b>	Número de animais
<b>T</b>	tempo
<b>IV</b>	intravenosa
<b>MODS</b>	Disfunção Múltipla de Órgãos (multiple organ disfunction syndrome)
<b>PO</b>	<i>Per Os</i> - via oral
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction

<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>LIMHO</b>	Laboratório Interação Microorganismo-Hospedeiro
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>MAIL</b>	Molecule possessing ankyrin-repeats induced by lipopolysaccharide

## CAPÍTULO 1

### LAMINITE EQUINA: REVISÃO DE LITERATURA

#### INTRODUÇÃO

Laminite é uma manifestação secundária à enfermidade sistêmica que resulta em falência estrutural do mecanismo de aderência do casco ao esqueleto apendicular (Noschka et al., 2009, Eades 2010; Pollitt e Visser, 2010), provocando dor e perda da função locomotora (Belknap et al., 2007). Dessa maneira, laminite é uma condição devastadora para a carreira do cavalo acometido, provocando perdas financeiras significativas a equideocultura, além das implicações sobre o bem estar (Bailey et al., 2004; Allen, 2004). Além disso, quando os sinais clínicos são reconhecidos, as lesões no casco já estão estabelecidas e as opções terapêuticas são limitadas. De acordo com um levantamento feito nos EUA, depois da cólica, a laminite é a segunda causa pela qual o veterinário é requisitado. Cerca de 13% dos proprietários relataram terem tido problemas relacionados com laminite ao longo de um ano e 5% dos animais acometidos morreram ou foram sacrificados (USDA-NAHMS, 2000).

Apesar dos inegáveis avanços na compreensão da fisiopatologia da laminite, medidas terapêuticas e profiláticas eficazes ainda precisam ser desenvolvidas. O conhecimento detalhado da fisiopatologia da laminite é a chave para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficientes.

#### MICROESTRUTURA LAMELAR

Os equídeos são singulares quanto à estrutura da parte distal de seus membros. Milhares de anos de evolução resultaram em membros relativamente leves, apoiados sobre um único dedo e sobre uma estrutura ungueal extremamente especializada. Seus cascos protegem as estruturas internas mais

vulneráveis, absorvem e distribuem o impacto recebido pelo membro durante o apoio do peso e permitem o deslocamento por longas distâncias, mesmos em altas velocidades e sobre terrenos duros e acidentados. Dessa forma, os equídeos são altamente dependentes de uma conexão saudável entre o casco e o esqueleto apendicular (Pollitt, 2007a).

A funcionalidade do casco equino é associada à sua macro e micro anatomia, composta, grosso modo, por um estojo córneo conectado à falange distal por cerca de 560 a 600 lamelas longitudinais primárias. As lamelas córneas primárias do casco são entremeadas por correspondentes lamelas dérmicas primárias que se originam no tecido conjuntivo interposto entre o casco e osso falange distal. Cada lamela primária por sua vez possui ao logo de seu eixo longitudinal cerca de 150 a 200 endentações, chamada lamelas secundárias, com suas correspondentes dérmicas e epidérmicas se entremeando (Pollitt 2007a). Essa especialização histológica é única dos equídeos e tem como consequência a ampliação da interface dermoepidérmica, aumentando a adesão do estojo córneo ao esqueleto apendicular (Figura 1).

A estrutura microscópica lamelar normal consiste de células basais epidérmicas contendo um núcleo elíptico situado no pólo apical da célula. O pólo apical situa-se opostamente a membrana basal. O eixo longo do núcleo celular é orientado perpendicularmente a membrana basal. A membrana basal, comumente identificada através de coloração de PAS (Periodic Acid Schiff), penetra profundamente nas criptas formadas por duas lamelas epidérmicas secundárias, contornando o topo afilado da

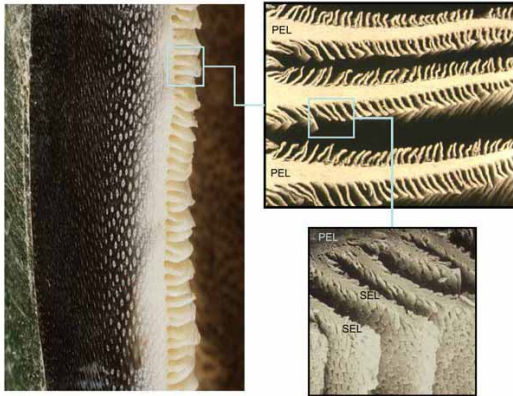


Figura 1 – Parte interna da parede do casco demonstrando as lamelas epidérmicas primárias (PEL) e as lamelas epidérmicas secundárias (SEL) (Pollitt 2007b).

lamela em direção ao eixo ceratinizado (lamela epidérmica primária) e a base arredondada voltada para a lamela dérmica primária. A distância entre a membrana basal e o eixo ceratinizado é de 1 a 2 células epidérmicas basais (Figura 2).

#### EVENTOS MICROESTRUTURAIS NA LAMINITE

Embora os cascos dos equídeos sejam extremamente resistentes às exigências do meio externo, a destruição de sua microestrutura pela laminite tem consequências catastróficas para a sobrevivência do indivíduo acometido.

A perda da integridade da junção dermoepidérmica resulta na falta de adesão do casco ao esqueleto, permitindo variados graus de deslocamento entre o estojo córneo e a falange distal, produzindo incapacidade de sustentação do peso e de locomoção.

Desde o início das pesquisas com laminite, tem se estabelecido uma forte correlação entre os danos microestruturais e a gravidade dos sinais clínicos (Pollitt, 1996). À medida que a laminite se desenvolve, uma sequência de eventos microscópicos se segue. Com base nesses eventos, três graus histológicos foram propostos para descrever

a gravidade das lesões nas lamelas do casco (Pollitt 1996; Pollitt e Daradka 1998).

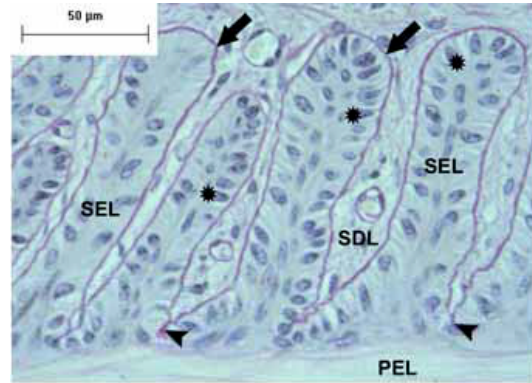


Figura 2- Fotomicrografia de corte histológico das lamelas epidérmicas secundárias (SEL) normais demonstrando a membrana basal marcada em magenta. O topo da lamela epidérmica secundária é arredondado e voltado para a lamela dérmica primária (setas). O topo da lamela dérmica secundária é afilado (SDL) (cabeça de seta) e próximo da lamela epidérmica primária (PEL) ou eixo ceratinizado. As células epidérmicas basais têm o núcleo oval e orientado perpendicularmente à membrana basal (asterisco) (Pollitt 2007b).

Grau 1: Durante a fase de desenvolvimento da laminite, as células epidérmicas basais e parabasais tornam-se alongadas e parecem deslizar umas sobre as outras na medida em que a lamela epidérmica secundária se adelgaça e tem seu topo afilado ao invés de arredondado (French e Pollitt 2004; Pollitt 1996). Nesse momento, a membrana basal perde sua adesão às células basais no topo da lamela epidérmica secundária dando origem a pequenos bulbos em forma de tetos de vaca. Os núcleos das células basais tornam-se arredondados e situados mais próximos da base celular e da membrana basal. Alguns núcleos que permanecem alongados podem ter sua orientação paralela ao invés de perpendicular ao eixo da lamela epidérmica secundária. O topo afilado da lamela dérmica secundária permanece próximo do eixo ceratinizado (Figura 3).

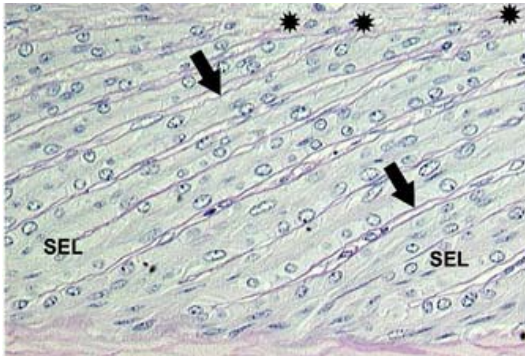


Figura 3- Fotomicrografia das lamelas secundárias demonstrando alterações histológicas de grau 1. O topo das lamelas epidérmicas secundárias (SEL) assume a forma afilada e a membrana basal (setas), corada por PAS se destaca das células basais nessa região (asteriscos) (Pollitt, 2007b).

Grau 2: À medida que o descolamento da junção dermoepidérmica avança a cada ciclo de apoio de peso do cavalo, a membrana basal se torna ausente na base da lamela epidérmica secundária (Pollitt e Daradka 1998). A membrana basal se retrai entre as lamelas epidérmicas secundárias e leva consigo o tecido conjuntivo e capilares da lamela dérmica secundária. As células epidérmicas basais que perderam sua conexão a membrana basal não parecem sofrer necrose.

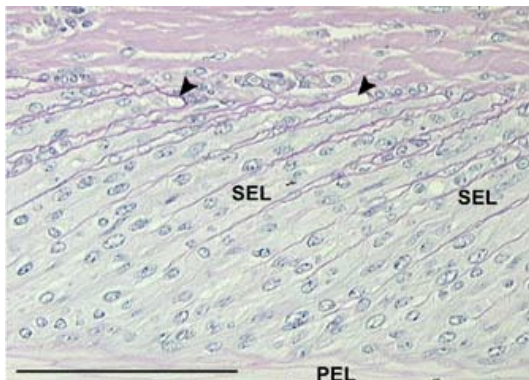


Figura 4- Fotomicrografia das lamelas secundárias demonstrando alterações histológicas de grau 2. O topo das lamelas epidérmicas secundárias assume a forma afilada e a membrana basal (setas), corada por PAS se destaca ainda mais das células basais, formando pequenas capas vazias em forma de teta de vaca (setas). A membrana basal desapareceu da base das lamelas epidérmicas secundárias e existe pouco tecido conjuntivo e capilares entre elas. A membrana basal no topo da lamela dérmica agora está longe

da lamina epidérmica primária ou eixo ceratinizado (Pollitt, 2007b).

Grau 3: Nesse estágio, bainhas de membrana basal são totalmente arrancadas de sua conexão às lamelas epidérmicas secundárias e formam agregados no meio do tecido dérmico próximo das lamelas epidérmicas. As lamelas epidérmicas secundárias são vistas como colunas isoladas sem nenhuma conexão com o tecido dérmico.

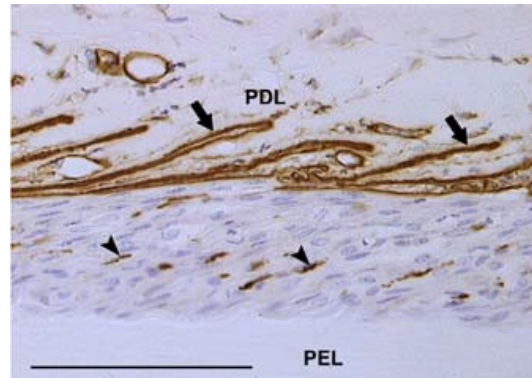


Figura 5 - Fotomicrografia das lamelas secundárias demonstrando alterações histológicas de grau 3. Apenas vestígios da membrana basal (cabeças de setas) permanecem entre as lamelas epidérmicas secundárias. As lamelas dérmicas primárias se encontram totalmente desconectadas do tecido dérmico agora separado pela membrana basal arranjada em tiras livres coradas em marrom por imunohistoquímica para colágeno tipo IV (Pollitt, 2007b).

## FISIOPATOLOGIA DA LAMINITE

A progressão dos eventos biomecânicos ocorridos dentro do casco parece ser semelhante, independente da causa inicial que deflagrou a laminite. Dessa forma, é provável que exista um padrão ou evento comum que possa ser ativado por uma grande variedade de condições clínicas associadas ao aparecimento da doença (Peroni et al., 2006). A lise da membrana basal (MB) e a perda da adesão com as células epidérmicas basais parecem ser os eventos histológicos principais que caracterizam a falência estrutural capaz de levar à perda da sustentação da falange distal dentro do casco (Pollitt, 1996). Contudo, os eventos iniciais que

desencadeiam a lise da MB ainda não são totalmente conhecidos e têm sido profundamente discutidos no meio científico. Parecem existir quatro grandes teorias sobre a origem da laminite. No passado, cada uma delas foi defendida individualmente em detrimento das outras. Atualmente, entretanto, pode-se considerar a complexa fisiopatologia da laminite como um processo envolvendo múltiplas vias. Essas vias interagem e assumem maior ou menor importância de acordo com o período considerado ou mesmo com o evento desencadeador. Com propósito didático, os eventos fisiopatológicos serão considerados separadamente a seguir.

### EVENTOS VASCULARES

A expectativa da existência de isquemia das lamelas do casco foi apoiada por evidências de vasoconstrição em estudos com dígitos isolados (Allen et al., 1990, Peroni et al., 2006). A produção e subsequente absorção de aminas vasoativas no intestino grosso a partir da fermentação de carboidratos hidrolisáveis por bactérias gram positivas têm sido apontadas como um evento inicial da laminite aguda. Estudos têm demonstrado o aumento na produção de feniletilamina, isoamilamina, putrescina e cadaverina a partir de 26 tipos diferentes de bactérias cecais, incluindo *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus sp* (Baley et al., 2002; Baley et al., 2003). O baixo pH cecal induzido pela produção aumentada de ácido láctico promove alteração da permeabilidade intestinal com consequente absorção de aminas e toxinas potencialmente deflagradoras da falha lamelar. Uma vez presentes na circulação digital, essas substâncias mimetizam a ação de aminas endógenas, como as catecolaminas e serotonina, levando à vasoconstrição e isquemia do tecido lamelar (Crawford et al., 2007). Contudo, estudos de pelo menos três laboratórios independentes, concordam atualmente que na fase de desenvolvimento da laminite

existe vasodilatação e que a vasoconstrição pode prevenir o desenvolvimento da laminite. Além disso, terapias destinadas à isquemia têm sido consistentemente falhas (Pollit e Visser, 2010).

### EVENTOS ENZIMÁTICOS

Evidências da desintegração da junção dermoepidérmica (membrana basal) e da expressão aumentada de metaloproteinases (MMP) em cavalos com laminite experimentalmente induzida ou de ocorrência natural foram demonstradas. MMP ativadas seriam capazes de degradar a estrutura protéica da membrana basal (Pollitt e Daradka, 1998), causando a separação entre as lamelas dérmicas e epidérmicas (Pollitt, 1996). Um estudo em que foi utilizado o explante de tecido lamelar exposto ao sobrenadante da cultura de *Streptococcus bovis*, demonstrou a separação dermoepidérmica e a ativação de MMP-2 e MMP-9 (Mungall et al., 2001). De fato, após a chegada de substratos hidrolisáveis ao ceco, ocorre a rápida proliferação de *Streptococcus bovis* (*ou lutetiensis*) e *Streptococcus equinus*, resultando em uma queda brusca do pH cecal (Garner et al., 1978). A acidez do conteúdo cecal provoca lesões na mucosa, permitindo a translocação de bactérias e produtos bacterianos para a circulação (Krueger et al., 1986). Contudo, faltam evidências de que substratos solúveis derivados de *S. lutetiensis* sejam os responsáveis pelos eventos iniciais da separação dermoepidérmica em casos de laminite. Além disso, em um estudo recente foi demonstrado que a marcante expressão de MMP-9 se dá na forma inativa e a ativação de MMP-2 ocorre após 12 horas do início da desintegração da membrana basal (Visser e Pollit, 2012)

Atualmente, a marcante expressão do gene ADAMTS-4 em estágios precedentes aos da ativação das MMP, sinaliza para o envolvimento de outra enzima capaz de

modificar os componentes proteoglicanos da membrana basal (Pollitt e Visser, 2010). Os defensores dessa teoria acreditam que os eventos inflamatórios que se seguem são uma consequência da injúria inicial à membrana basal. Isso se deve ao fato de que cortes histológicos rotineiros (corados com hematoxilina e eosina) obtidos de cavalos na fase de desenvolvimento da laminite não demonstraram uma expressiva presença de leucócitos, que só passam a ser mais bem percebidos após evidentes alterações na membrana basal (Pollitt, 1996).

### **EVENTOS METABÓLICOS**

Independente dos fatores predisponentes já reconhecidos da laminite como as doenças do sistema gastrointestinal e outras condições sépticas, evidências clínicas têm demonstrado uma associação frequente de quadros de laminite com animais obesos e com resistência insulínica (Treiber et al., 2006; Frank et al., 2006; Bailey et al., 2007; Bailey et al., 2008). Embora a descrição fenotípica dos animais predispostos ao desenvolvimento da laminite varie, as características mais reconhecidas são obesidade generalizada ou localizada (principalmente na face dorsal do pescoço, base da cauda, axilas e prepúcio ou glândulas mamárias), resistência insulínica, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia. Esse fenótipo coincide com o da síndrome metabólica em seres humanos que agrupa sinais predisponentes para doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2, incluindo obesidade visceral, hipertensão, resistência insulínica e dislipidemia (Geor e Frank, 2009). Assim, tais características fenotípicas consideradas em conjunto suplantam o risco que cada uma individualmente representa para o desenvolvimento da laminite em cavalos, bem como doenças cardiovasculares e diabetes em humanos. Por essa razão, o termo Síndrome Metabólica Equina (SME)

foi sugerido por Jonhson (2002) para agrupar características fenotípicas e clínicas predisponentes ao desenvolvimento da laminite equina. Além disso, o uso do termo SME é útil para distinguir animais acometidos pela Síndrome de Cushing ou por hipotireoidismo (Jonhson et al., 2010). Animais com essas características são predispostos a desenvolverem laminite ou terem recidivas agudas em casos crônicos quando encontram certas condições de pastagem em países de clima temperado (laminite associada ao pasto). Um estudo comparando dados metabólicos de 54 pôneis com laminite e 106 sem a doença, demonstrou que o escore corporal e os níveis de insulina e triglicérides foram maiores nos animais com laminite (Treiber et al., 2006).

O mecanismo fisiopatológico pelo qual as endocrinopatias desencadeiam a laminite não é completamente conhecido. Perturbações endócrinas como hiperadrenocorticismo, gestação, obesidade e a resistência insulínica parecem ser um componente comum. A falha do mecanismo de utilização de glicose pelos ceratinócitos foi capaz de causar a separação da junção dermo-epidérmica em tecido lamelar explantados de equinos (Pass et al., 1998). Por outro lado, foi demonstrada recentemente a ausência do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT-4) nos ceratinócitos lamelares, de forma que a insulina parece não participar diretamente do mecanismo de entrada de glicose nessas células (Asplin et al., 2007). Dessa forma, é possível que a falência da junção dermo-epidérmica nos distúrbios da regulação glicêmica não envolva a participação da insulina.

No estado de resistência insulínica, a hiperglicemia, sustentada ao longo do tempo, pode afetar diretamente o tônus vascular e promover uma susceptibilidade à trombose (Poitout e Robertson, 2002). Dessa forma, hipoxia secundária a

alterações vasculares pode desencadear a falência da interface dermo-epidérmica devido a uma endoteliopatia glicotóxica (Jonhson et al., 2010). Contudo, hiperglicemia é um achado raro em cavalos com Síndrome Metabólica, tornando essa hipótese pouco plausível (Eades, 2010).

Recentemente, foi demonstrado que a manutenção de níveis sanguíneos supra-fisiológicos de insulina foi capaz de induzir o quadro de laminite. Contudo, no modelo utilizado, as concentrações de insulina alcançadas foram bem acima daquelas observadas em casos naturais de resistência insulínica. Entretanto, uma hiperinsulinemia em concentrações mais baixas, porém de longa duração, poderia causar laminite (Asplin et al., 2007; Nourian et al., 2009). O mecanismo pelo qual a hiperinsulinemia causa laminite não é conhecido. A hipóxia lamelar causada por desequilíbrio microvascular e ativação de proteases através da ação da insulina tem sido sugerida (Asplin et al., 2007).

Obesidade também tem sido sugerida como fator causal ou predisponente ao desenvolvimento da laminite. A sobrecarga de peso sobre os cascos, a resistência insulínica obesidade-dependente e a secreção de mediadores químicos pró-inflamatórios são as explicações comumente apresentadas (Jonhson et al., 2010)

O tecido adiposo desempenha um papel importante nas funções metabólica, imune e vascular via produção de adiponectina, leptina, TNF- $\alpha$  e citocinas (Geor e Frank, 2009). Em condições normais os adipócitos secretam uma grande variedade de citocinas (adipocinas) que exercem funções autócrinas e parácrinas no tecido adiposo. Na presença de acúmulos anormais de gordura corporal no estado de obesidade, essas mesmas adipocinas são secretadas em quantidades supra-fisiológicas e têm acesso a circulação sistêmica, onde irão exercer

ações distantes do tecido de origem (função endócrina) (Jonhson et al., 2010). Grande parte dessas adipocinas é secretada por uma população de macrófagos recrutada ao tecido adiposo excessivamente depositado no estado de obesidade. Essas substâncias têm o potencial de causar laminite por suas propriedades pró-inflamatórias. Como exemplo, elevados níveis plasmáticos de mRNA para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram identificados em cavalos obesos (Vick et al., 2007) e TNF $\alpha$  elevado foi identificado como fator de risco em um grupo de pôneis propensos a laminite (Treiber et al., 2009). Além disso, concentrações elevadas de leptina, uma adipocina com potencial pró-inflamatório, foram encontradas no plasma de cavalos acometidos por laminite (Radin et al., 2009).

Afora a liberação sistêmica de mediadores inflamatórios, os macrófagos do tecido adiposo de seres humanos e animais de laboratórios têm a propriedade de converterem cortisona em cortisol através da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase-1. Elevados níveis de cortisol contribuem para o quadro de resistência insulínica hepática além de expandir as reservas adiposas pela conversão de preadipócitos em adipócitos ativos (Jonhson et al., 2010). Além disso, o tecido adiposo libera grandes quantidades de ácidos graxos livres na circulação, onde contribuem para a resistência insulínica e estimulam o processo inflamatório exercendo ação sobre macrófagos (Jonhson et al., 2010).

## EVENTOS INFLAMATÓRIOS

Leucócitos precocemente recrutados ao tecido lamelar podem ser os responsáveis pela cascata de eventos que resulta em danos à membrana basal e separação dermo-epidérmica (Belknap, 2010). Recentemente, foram encontradas evidências da infiltração de leucócitos através de anticorpos anti Calprotectina e

CD163, antes do aparecimento de alterações nas células epidérmicas basais e na membrana basal durante a fase de desenvolvimento (Faleiros et al., 2011b). Esses achados contrariam dados anteriores onde leucócitos não foram detectados em cortes histológicos de rotina na fase de desenvolvimento (Pollitt, 1996). É possível que isso se deva à dificuldade de visualização em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina e não verdadeiramente à ausência de tais células nesse período. Dessa maneira, foi sugerido que neutrófilos e macrófagos ativados durante a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) provocada pela sobrecarga de carboidratos sejam os responsáveis pela falência estrutural da membrana basal, semelhante ao mecanismo de lesão remota já comprovada em outros órgãos (Alves-Filho et al., 2008; Faleiros et al., 2008).

Seguindo essa linha de raciocínio, as doenças que colocam os cavalos sob intenso risco de laminite comumente são aquelas que comprometem a integridade da parede do sistema gastrointestinal (isquemia intestinal, colite e duodenojejunité) e várias outras condições sépticas (pleuropneumonia, piometra, etc...). Tais condições exibem sinais semelhantes aos da SIRS associada à sepse em seres humanos. Além disso, as alterações histológicas iniciais demonstradas nas lamelas do casco se assemelham às ocorridas nos órgãos destinados à falência em condições sépticas em seres humanos (Black et al., 2006). Laskoski et al. (2009), estudando o tecido lamelar de cavalos que morreram devido a cólica, observaram alterações estruturais compatíveis com laminite. Além disso, a gravidade das lesões foi diretamente proporcional à intensidade dos sinais sistêmicos apresentados antes do óbito. Contudo, existem diferenças importantes entre humanos e cavalos com relação à expressão da SIRS. Em seres humanos, o fígado e os pulmões são importantes órgãos

alvo da resposta inflamatória sistêmica. Macrófagos alveolares e Células de Kupffer no fígado são capazes de liberar inúmeras citocinas próinflamatórias que, além de amplificarem a resposta sistêmica, podem levar a danos colaterais em seus órgãos hospedeiros. Por outro lado, embora a expressão de citocinas (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) esteja aumentada no fígado e pulmões nos estágios iniciais da laminite induzida por extrato de BWE (Black Walnut Extract), o aumento não é tão elevado quanto aquele observado no tecido lamelar durante esse mesmo período, nem tão expressivos como em outros modelos experimentais de sepse. Assim, parece que em equinos o fígado e os pulmões são relativamente protegidos dos efeitos da resposta inflamatória sistêmica em comparação com o tecido lamelar (Stewart et al., 2009).

Leucócitos parecem desempenhar um papel central na injúria tecidual em várias doenças e estão intimamente relacionados à falência orgânica na sepse humana (Alves-Filho et al., 2008). A ativação sistêmica de leucócitos e a migração dessas células para o interstício têm sido demonstradas nas lamelas e em outros órgãos de cavalos durante a fase de desenvolvimento da laminite (Black et al., 2006; Stewart et al., 2009). Assim, inflamação sistêmica semelhante a SIRS, prévia ao desenvolvimento da falência de órgãos, parece preceder a falência lamelar em cavalos (Hurley et al., 2006; Belknap et al., 2007; Loftus et al., 2007; Stewart et al., 2009). De fato, o aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8) no estágio de desenvolvimento da laminite, indica que a presença de quimiocinas atrativas de leucócitos (principalmente IL-8) pode desempenhar importante papel na migração leucocitária nos eventos iniciais da laminite (Belknap et al., 2007; Faleiros et al., 2009; Faleiros et al., 2011b).

O processo de migração leucocitária depende da ativação endotelial por citocinas

como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , bem como a presença de fatores quimiotáticos como CXCL- 8 (ou IL-8). Inicialmente, o endotélio é ativado por TNF- $\alpha$ , levando a expressão sequencial de P-selectina e E-selectina que se ligam momentaneamente à superfície dos neutrófilos, permitindo a marginação e o rolamento. Essa fase coincide com a leucopenia ocorrida no início da sepse. Em seguida, interações entre integrinas nos neutrófilos e no endotélio, modificadas pela presença de CXCL-8, aumentam a afinidade entre o leucócito e a parede vascular, permitindo seu extravasamento. Após a diapedese, a migração ocorre através de um gradiente de CXCL-8, concomitante com a ativação celular que leva ao “burst respiratório” com liberação do conteúdo lisossômico e destruição tecidual (Lunn e Hurley, 2009). Dessa forma, CXCL-8 é uma molécula chave para a migração e ativação de neutrófilos em órgãos humanos danificados pela sepse e pode ser determinante para os estágios iniciais da laminite (Eades, 2010).

## QUIMIOCINAS

Quimiotaxia é o processo pelo qual as células se deslocam sob a ação de um gradiente químico em solução. Substâncias quimioatraentes estimulam a passagem de leucócitos do interior dos vasos para o interstício. O processo de migração através da matriz extracelular (ECM) é um processo regulado pela interação do citoesqueleto celular, quimiocinas, moléculas de adesão e a trama de fibrilas da ECM. Diferente da migração tridimensional das células mesenquimais, leucócitos possuem uma imensa capacidade de deformação do corpo celular e não necessitam da clivagem proteolítica da ECM para sua movimentação. Ao contrário, regiões onde a trama de fibras da ECM é mais frouxa (ao longo de vasos e embaixo de membranas basais) servem de caminho de menor resistência ao deslocamento dessas células (Friedl e Wolf, 2009).

Embora isso seja um processo natural com o objetivo de combater infecções, remover células danificadas e promover a cicatrização, o recrutamento descontrolado de leucócitos é capaz de provocar lesão aos tecidos, resultando em disfunção ou falência de órgãos, podendo acarretar o óbito (Bizzarri et al., 2006).

Entre diversos fatores quimiotáticos, as quimiocinas exercem efeito direto sobre os leucócitos. Essas moléculas são pequenos peptídeos (8-10 kD) classificados em 4 subfamílias de acordo com a presença de cisteína no terminal amina: CXC, CC, CX3C e C. (Murphy et al., 2000; Gangur et al., 2002; Faleiros et al., 2011a, Guerreiro et al., 2011, Salanga e Handel, 2011). As quimiocinas CXC ainda podem ser sub classificadas em ERL+ e ELR – baseadas na presença ou ausência do tripéptido Glu-Leu-Arg (ELR) na amina terminal (Faleiros et al., 2011a, Guerreiro et al., 2011). As CXC ELR+ têm como característica comum a habilidade de recrutar neutrófilos ao tecido inflamado. Contudo, demonstrou-se que CXC ELR+ também ativam e produzem resposta quimiotática em basófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos, células endoteliais e células musculares lisas (Fernandez e Lolis 2002; Laing e Secombes, 2004). Em resposta ao insulto tecidual, CXC ERL+ passam a ser expressas na superfície endotelial e são capazes de iniciar o processo de rolamento e imobilização dos neutrófilos circulantes. (Rainger et al., 1997). Interleucina 8 (CXCL8), proteína epitelial ativadora de neutrófilos (CXCL5), peptídeo 2 quimiotático de granulócitos (CXCL6), proteína ativadora de neutrófilos (CXCL7), estimuladores do crescimento de melanoma (CXCL1, CXCL2 e CXCL3) pertencem a subfamília CXC ELR+ (Murphy et al., 2000).

As quimiocinas CXC ELR - (CXCL9, CXCL10, CXCL11 e CXCL13) e a subfamília CC atraem principalmente monócitos, linfócitos, células dendríticas, basófilos e eosinófilos e são consideradas

fracas atrativas de neutrófilos (Laing e Secombes, 2004). Além disso, CXC ELR- possuem propriedades angiostáticas e antiangiogênicas (Fernandez e Lolis, 2002; Laing e Secombes, 2004; Guerreiro et al., 2011).

A ação das quimiocinas CXC ERL+ é mediada por receptores acoplados a proteína G (GPCRs) CXCR1 e CXCR2 (Mukaida, 2003; Kim et al., 2011). Uma vez ativados, esses receptores deflagram um sinal transmembrana pela ativação de proteínas GTP, fosfolipase C e formação de um segundo mensageiro, inositol 1,4,5-trifosfato, com subsequente elevação do cálcio intracelular. Além disso, ativação de fosfatidil-inositol3-kinase G e tirosina-kinase 2 rica em prolina (Pyk2) parece aumentar em resposta a CXCL8 (Casilli et al., 2005).

CXCR1 e CXCR2 representam a maioria dos receptores expressa na superfície dos neutrófilos (Guerreiro et al., 2011). Embora tenham sido estruturalmente bem caracterizados, os efeitos biológicos exercidos por cada um deles ainda não foi bem elucidado. Parece que a quimiotaxia de neutrófilos mediada por CXCL8 envolve principalmente a ação sobre CXCR1 (Bizzari et al., 2006).

CXCL8 ou Interleucina 8 (IL-8) é um membro da subfamília CXC das quimiocinas e é uma potente substância atrativa para neutrófilos. IL-8 tem sido detectada em vários tecidos humanos afetados por condições inflamatórias como psoríase (Giustizieri et al., 2001), asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (Woodman et al., 2006), todas condições associadas com grave infiltração neutrofilica. De forma semelhante, no cavalo, desafios antigênicos levam ao aumento da expressão de CXCL8, e seu respectivo mRNA nos tecidos, de animais acometidos por doença pulmonar crônica e obstrução recorrente de vias aéreas,

condições também associadas a forte infiltração neutrofilica (Franchini et al., 2000; Ainsworth et al., 2006).

## QUIMIOCINAS CXC E LAMINITE

O envolvimento de quimiocinas CXC ERL+ em doenças humanas, cuja presença de neutrófilos desempenha um papel central na fisiopatologia, tem sido bem caracterizado (Bizzari et al., 2006). Da mesma forma, a atenuação do influxo de neutrófilos diminuiu a gravidade dos sinais em modelos murinos de colite ulcerativa, injúrias de reperfusão, bronquiólite obstrutiva e alguns tumores. A diminuição do influxo de neutrófilos foi conseguida na maioria dos estudos pela ação de anticorpos anti-caderinas ou anti-quimiocinas, demonstrando que a inibição seletiva da ação quimioatraente de CXC ERL+ representa um alvo terapêutico promissor (Bizzari et al., 2006).

Em cavalos com laminite de ocorrência natural ou experimentalmente induzida, a presença de neutrófilos parece desempenhar um papel central nas lesões iniciais ou mesmo na progressão da doença (Faleiros et al., 2011b). De fato, o aumento da expressão de mRNA de CXCL1, CXCL6 e CXCL8 foi detectada nas fases de desenvolvimento e de claudicação em um modelo de laminite induzida pela sobrecarga com carboidratos (Faleiros et al., 2011a). A expressão aumentada dessas quimiocinas ocorreu em período imediatamente precedente ao aparecimento de leucócitos no mesmo modelo (Faleiros et al., 2011b). De forma interessante, CXCL8 foi expressa em níveis bastante elevados nas lamelas do casco em comparação com o tecido pulmonar e hepático em um modelo de indução de laminite por extrato de noqueira preta (BWE) (Stewart et al., 2009).

CXCL8 também tem sido implicada na patogênese da endotoxemia equina.

Endotoxinas foram capazes de aumentar a expressão de CXCL8 nos neutrófilos “*in vitro*” (Neuder et al., 2009) e no sangue quando injetadas sistemicamente (Nieto et al., 2009). Além disso, o aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8) no estágio de desenvolvimento da laminite, indica que a presença de quimiocinas atrativas de leucócitos (principalmente IL-8) pode desempenhar importante papel na migração leucocitária nos eventos iniciais da laminite (Belknap et al., 2007; Faleiros et al., 2009a; Faleiros et al., 2011b).

Dessa forma, CXCL8 é uma molécula chave para a migração e ativação de neutrófilos em órgãos humanos e de equinos danificados pela SIRS. O bloqueio farmacológico seletivo de CXCL8 representa um promissor horizonte no controle das lesões de origem inflamatória com potencial para o tratamento e prevenção da laminite equina (Bizzarri, et al., 2006; Coelho et al., 2008).

#### ANTAGONISMO DE CXCR1/2 COMO ALVO TERAPÊUTICO

A propriedade de certos antiinflamatórios não esteróides (cetoprofeno e ibuprofeno) em bloquear a quimiotaxia de neutrófilos induzida por IL-8 de uma forma independente da inibição das cicloxigenases, chamou a atenção dos pesquisadores para uma novo mecanismo de ação (Bertini, et al., 2004, Bizzarri, et al., 2006). Assim, a partir dessas observações preliminares, o laboratório italiano Dompé iniciou um programa direcionado a identificar novas moléculas inibidoras da quimiotaxia induzida por CXCL-8, visando especialmente o tratamento das lesões de isquemia e reperfusão. Dessa forma uma classe de derivados do ácido 2-arilfenilpropiónico foi extensivamente investigada, levando a seleção de acilmetanosulfonamida reparixina (Bizzarri et al., 2006).

Reparixina é capaz de inibir a ação dos receptores sem, no entanto, evitar a ligação de seus agentes agonistas.

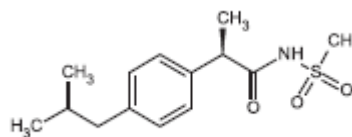


Figura 6- Estrutura química da reparixina, um antagonista alostérico de CXCR1 e CXCR2 (Bizzarri et al., 2006)

Esse mecanismo é chamado de antagonismo alostérico (Bertini et al., 2004, Bizzarri et al., 2006, Moriconi et al., 2007). A droga tem se mostrado um potente antagonista da migração de neutrófilos tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (Bertini et al., 2004). Assim, várias pesquisas têm sido realizadas sobre seus efeitos em lesões onde o envolvimento de neutrófilos é bem caracterizado.

Reparixina, além de inibir a quimiotaxia induzida por IL-8, foi capaz de bloquear a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular, inibir a degranulação e produção de citocinas inflamatórias, bem como impedir a migração de linfócitos T e células NK (Casilli et al., 2005). Em modelos de injúria de isquemia e reperfusão (I/R) no fígado de ratos, reparixina demonstrou diminuir a infiltração neutrofilica e a necrose hepática (Cavalieri et al., 2005, Clarke et al., 2011). Em modelos murinos de isquemia e reperfusão cerebral, reparixina diminuiu a infiltração neutrofilica demonstrada histologicamente e pela atividade de mieloperoxidase. Além disso, o fármaco melhorou a recuperação dos déficits neurológicos nos ratos tratados (Garau et al., 2006, Villa et al., 2007). O pré tratamento de ratos receptores com reparixina, foi capaz de prevenir a infiltração de granulócitos e melhorar a função de rins transplantados (Cugini et al., 2005). A produção de IL-1 $\beta$  foi reduzida pela adição de reparixina a neutrófilos humanos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) e CXCL8 ‘in

vitro'. Além disso, reparixina foi capaz de bloquear a liberação de MMP-9 dos neutrófilos induzida por CXCL8 (Casilli et al 2005). Por outro lado, reparixina aplicada por via intravenosa em voluntários humanos não foi capaz de reduzir a resposta inflamatória sistêmica medida pela expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Leitner et al., 2007).

Apesar das recentes evidências da participação de leucócitos na origem da laminite (Fontaine et al. 2001, Belknap et al. 2007, Faleiros et al. 2009a, Faleiros et al. 2009b, Faleiros et al. 2011a) e do potencial terapêutico da reparixina, nenhum estudo com essa droga havia sido conduzido na espécie equina até o momento.

## **INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE LAMINITE**

A ocorrência natural da laminite equina quase sempre está associada a uma manifestação local de doença inflamatória ou metabólica sistêmica. As doenças do trato gastrointestinal como a sobrecarga com grãos, enterite proximal, colite e acidentes intestinais que necessitam de correção cirúrgica são frequentemente seguidos pelo aparecimento de laminite aguda. Contudo, o tempo e a magnitude de desenvolvimento obviamente dependem de vários fatores patofisiológicos, tornando o estudo dos casos naturais difíceis de serem padronizados. Dessa forma, modelos de indução da doença foram desenvolvidos a partir dos anos 70 (Garner et al., 1978; Minnick et al., 1987). Tradicionalmente, a endotoxemia equina e a laminite têm sido induzidas experimentalmente na espécie equina através do fornecimento de carboidratos (amido) ou extrato de “black walnut” via sonda nasogástrica. No primeiro, utiliza-se a colocação, via sonda nasogástrica, de uma solução aquosa de amido de milho (85%) e farinha de aveia (15%) na dose de 17,6 g/kg de peso vivo (Garner et al., 1978; Faleiros et al.,

2011ba). Esse modelo mimetiza a sobrecarga com carboidratos comum na prática clínica. Contudo, em condições de laboratório o modelo tem demonstrado uma variação acentuada da resposta, com presença de óbitos, necessidade de eutanásia nos casos muito graves e alguns animais não desenvolvem laminite (van Eps e Pollitt, 2006). Por outro lado, a observação de que animais estabulados sobre camas de serragem de Nogueira Preta (*Juglans nigra*) nos EUA frequentemente desenvolviam laminite deu origem ao modelo de indução com “Black Walnut” (Belknap, 2010). Farinha do cerne da madeira (BWE) é colocada em água por 12 horas (2g/kg peso vivo em 7 litros de água) e dada ao animal via sonda nasogástrica (Minnick et al., 1987). Nesse modelo observa-se uma rápida resposta inflamatória sistêmica acompanhada de um início precoce e fulminante do quadro de laminite. Entretanto, a maioria dos animais não desenvolve a falha estrutural esperada para a gravidade do quadro agudo. Acredita-se que, embora ocorra uma resposta suprafisiológica inicialmente, a ingestão em bolus não é capaz de sustentar a inflamação pelo tempo necessário à ocorrência dos danos lamelares (Belknap, 2010)

Outra importante causa natural de laminite é o consumo de determinados pastos recentemente germinados em condições de clima temperado. Oligofrutoses ou frutanas acumuladas no caule de gramíneas nessas condições não são digeridas no intestino delgado dos equinos e chegam ao ceco onde servirão de substrato para a fermentação bacteriana (Milinovich et al., 2005; Van Eps e Pollitt, 2006; Milinovich et al., 2010). Os produtos ácidos da fermentação lesam a mucosa do ceco e cólon, permitindo a absorção de Padrões Moleculares Associadas a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associadas aos Danos teciduais (DAMPs). Essas moléculas estimulam leucócitos residentes e circulantes em todo o organismo a

produzirem citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 entre várias outras), desencadeando SIRS (Belknap, 2010).

Recentemente, um modelo utilizando oligofrutose foi apresentado como alternativa, reproduzindo o quadro de forma dose dependente e com baixa letalidade dos animais. O modelo mimetiza a laminite associada ao pasto e utiliza Raftilose P95, uma frutana extraída comercialmente da raiz de chicória (*Cichorium intybus*) (van Eps and Pollitt, 2006). Um modelo semelhante também tem sido utilizado para o estudo da laminite bovina (Thoenfer et al., 2004; Thoenfer et al., 2005). Embora outros modelos tenham sido usados para a indução de laminite em cavalos no Brasil (Martins Filho et al., 2008; Laskoski et al., 2012), o modelo utilizando oligofrutose ainda não foi avaliado em condições nacionais.

Em resumo, a perda de adesão da junção dermo-epidérmica parece ser o evento comum da falência estrutural do casco na laminite. Contudo, o mecanismo exato pela qual ela acontece permanece por ser esclarecido. Possivelmente, diversas vias fisiopatológicas se interajam para dar origem à separação lamelar. A infiltração de leucócitos, bem como a expressão de citocinas inflamatórias no tecido lamelar na fase que precede o aparecimento das lesões, sinaliza para o envolvimento dessas células na desintegração da junção dermoepidérmica. Uma predisposição provocada por obesidade e resistência insulínica poderia causar um estado alterado de resposta inflamatória em nível celular bem como respostas vasculares alteradas. Finalmente, estratégias que bloqueiam a migração de leucócitos aos tecidos representam um horizonte promissor na prevenção da laminite equina.

## REFERÊNCIAS

AINSWORTH, D.M.; WAGNER, B.; FRANCHINI, M. et al., Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.*, v. 67, n. 4, p. 669-677, 2006.

ALLEN, D. Overview of the Pathogenesis of Laminitis - Models and Theories. *AAEP Equine Laminitis Research Meeting and Panel, 2004*; Louisville, KY; 2004, p. 5-19.

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

ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; SPILLER F., et al., The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*. v. 30 n. 1, p. 3-9, 2008.

ASPLIN, K.E.; MCGOWAN, C.M.; POLLITT, C.C. et al., Role of insulin in glucose uptake in the equine hoof [abstract]. *J Vet Intern Med.*, v. 21, p. 668, 2007.

BAILEY, S.R.; BAILLON, M.L.; RYCROFT, A.N. et al., Identification of equine cecal bacteria producing amines in an in vitro model of carbohydrate overload. *Appl Environ Microbiol.*, v. 69, n. 4, p. 2087-2093, 2003.

BAILEY, S.R.; HABERSHON-BUTCHER, J.L.; RANSOM, K.J. ET AL., Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 69, p. 122-129, 2008.

BAILEY, S.R.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Current research and theories on the

- pathogenesis of acute laminitis in the horse. *The Vet J.*, v. 167, p. 129-142, 2004.
- BAILEY, S.R.; MENZIES-GOW, N.J.; HARRIS, P.A. et al.,. Effect of dietary fructans and dexamethasone administration on the insulin response of ponies predisposed to laminitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 231, p. 1365-1373, 2007.
- BAILEY, S.R.; RYCROFT, A.; ELLIOTT, J. Production of amines in equine cecal contents in an in vitro model of carbohydrate overload. *J Anim Sci.* v. 80, n. 10, p. 2656-2662, 2002.
- BELKNAP, J.K. Black walnut extract: an inflammatory model. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, v. 26, n.1, p. 95-101, 2010.
- BELKNAP, J.K.; GIGUÈRE, S.; PETTIGREW, A. et al.,. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. *Equine Vet J.*, v. 39, n. 1, p. 42-7, 2007.
- BERTINI, R.; ALLEGRETTI, M.; BIZZARRI, C., et al. Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: Prevention of reperfusion injury. *PNAS*, v. 101, n. 32, p. 11791–11796, 2004.
- BIZZARRI, C.; BECCARI, A.R.; BERTINI, R. et al.,. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharm Ther.*, v. 112, p. 139-149, 2006
- BLACK, S.J.; LUNN, D.P.; YIN, C. et al.,. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n.109 (1-2), p. 161-166, 2006.
- CASILLI, F.; BIANCHINI, A.; GLOAGUEN, I. et al. Inhibition of interleukin-8 (CXCL8/IL-8) responses by repertaxin, a new inhibitor of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Biochemical Pharmacology*, v. 69, n. 3, p. 385–394, 2005.
- CAVALIERI, B.; MOSCA, M.; RAMADORI, P. et al. Neutrophil recruitment in the reperfused-injured rat liver was effectively attenuated by repertaxin, a novel allosteric noncompetitive inhibitor of CXCL8 receptors: a therapeutic approach for the treatment of post-ischemic hepatic syndromes. *Int J Immunopathol Pharmacol.* v.18, p.475-486, 2005.
- CLARKE, C.; KUBOKI, S.; SAKAI, N., et al. CXC Chemokine Receptor-1 is Expressed by Hepatocytes and Regulates Liver Recovery After Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Hepatology*, v. 53, n. 1, p. 261-271, 2011.
- COELHO, F.M.; PINHO, V.; AMARAL, F.A. et al. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum.* v.58, n.8, p.2329-2337, 2008.
- CRAWFORD, C.; SEPULVEDA, M.F.; ELLIOTT, J. et al.,. Dietary fructan carbohydrate increases amine production in the equine large intestine: implications for pasture-associated laminitis. *J Anim Sci.*, v. 85, n. 11, p. 2949-2958, 2007.
- CUGINI, D.; AZZOLLINI, N.; GAGLIARDINI, E., et al. Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney International*, v. 67, p. 1753–1761, 2005.

- EADES, S.C. Overview of Current Laminitis Research. *Vet Clin Equine.*, v. 26, p. 51-63, 2010.
- FALEIROS, R.R., LEISE, B.S., WATTS, M. et al. Laminar chemokine mRNA concentrations in horses with carbohydrate overload-induced laminitis *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.144, n. 1–2(15), p.45-51, 2011a.
- FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.J. et al., Laminar Leukocyte Accumulation in Horses with Carbohydrate Overload-Induced Laminitis. *J Vet Intern Med.*, v. 25, p. 107–115, 2011b.
- FALEIROS, R.R.; LEISE, B.B.; WESTERMAN, T. et al.,. In vivo and in vitro evidence of the involvement of CXCL1, a keratinocyte-derived chemokine, in equine laminitis. *J Vet Intern Med.*, v. 23, n. 5, p. 1086-96, 2009.
- FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G.; ALVES, G.E.; et al.,. Local and remote lesions in horses subjected to small colon distension and decompression. *Can J Vet Res.*, v.72, p.68-76, 2008.
- FERNANDEZ, E.J., LOLIS, E.,. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* V. 42, p. 469–499, 2002.
- FONTAINE, G.L.; BELKNAP, J.K.; ALLEN, D. et al., Expression of interleukin-1beta in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. *Am J Vet Res.*, v. 62, n. 5, p. 714-720, 2001.
- FRANCHINI, M.; GILL, U.; VON FELLEBERG, R. et al., Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res.*, v. 61, n. 11, p. 1369-1374, 2000.
- FRANK, N.; ELLIOTT, S.B.; BRANDT, L.E. et al.,. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 228, p. 1383-1390, 2006.
- FRENCH, K.R. AND POLLITT, C.C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model. *Equine vet. J.*, v. 36, p. 230-235, 2004.
- FRIEDL, P., WOLF, K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev.* v. 28, p.129–135, 2009).
- GANGUR, V., BIRMINGHAM, N. P., THANESVORAKUL, S. Chemokines in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol.* v 86(3–4), p.127–136, 2002.
- GARNER, H.E., MOORE, J.N., JOHNSON, J.H., et al.,. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 10, p. 249-252, 1978.
- GARAU, A.; BERTINI, R.; MOSCA, M., et al. Development of a systemically-active dual CXCR1/CXCR2 allosteric inhibitor and its efficacy in a model of transient cerebral ischemia in the rat. *Eur. Cytokine Netw.*, v. 17, n 1, p.35-41, 2006.
- GEOR, R.; FRANK, N. Metabolic syndrome. From human organ disease to laminar failure in equids. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 129, p. 151-154, 2009.
- GIUSTIZIERI, M.L.; MASCIA, F.; FREZZOLINI, A. et al., Keratinocytes from

patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 107, p. 871–877, 2001.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J.M. As quimiocinas e os seus receptores. *Acta Med Port.* v.24, n.S4, p. 967-976, 2011

HURLEY, D.J.; PARKS, R.J.; REBER, A.J. et al.,. Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 110(3-4), p. 195-206, 2006.

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

JOHNSON, P.J.; WIEDMEYER, C.E.; LA CARRUBBA, A. et al.,. Laminitis and the Equine Metabolic Syndrome. *Vet Clin Equine.*, v. 26 , p.239–255, 2010.

KIM, H.Y.; CHOI, J.H.; KANG, Y.J. et al.,. Reparixin, an inhibitor of CXCR1 and CXCR2 receptor activation, attenuates blood pressure and hypertension-related mediators expression in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 34, n. 1, p. 120-127, 2011.

KRUEGER, A.S.; KINDEN, D.A.; GARNER, H.E. et al.,. Ultrastructural study of the equine cecum during onset of laminitis. *Am. J. Vet. Res.* v. 47, p. 1804-1812, 1986.

LAING, K.J., SECOMBES, C.J. Chemokines. *Dev. Comp. Immunol.* V.28, p. 443–460, 2004.

LASKOSKI, L.M.; VALADÃO, C.A.A.; VASCONCELOS, R.O., et al. Alterações

morfológicas de tecido laminar do casco e parâmetros clínicos e laboratoriais de equinos com síndrome cólica letal. *Pesq. Vet. Bras.* v. 29, n. 9, p.731-735, 2009.

LASKOSKI, L.M., VALADAO, C.A.A., VASCONCELOS, R.O, et al., Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) e calprotectina no tecido laminar de equinos após obstrução jejunal, tratados ou não com hidrocortisona. *Pesq. Vet. Bras.* v. 32, n. 9, p. 817-823, 2012.

LEITNER, J.M.; MAYR, F.B.; FIRBAS, C., et al. Reparixin, a specific interleukin-8 inhibitor, has no effects on inflammation during endotoxemia. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007 Jan-Mar;20(1):25-36.

LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; PETTIGREW, A. et al.,. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut- induced laminitis. *Am J Vet Res.*, v. 68, n. 11, p. 1205-1211, 2007.

LUNN, D.P.; HURLEY, D.J. The role of leukocyte biology in laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 129(3-4), p. 158-160, 2009.

MARTINS FILHO, L.P., FAGLIARI, J.J., MORAES, J.R.E., SAMPAIO, et al.,. Influência da heparina sódica na ocorrência de laminite equina induzida por sobrecarga de carboidratos *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.6, p.1358-1366, 2008

MILINOVICH, G.J.; KLIEVE, A.V.; POLLITT, C.C. et al., Microbial Events in the Hindgut During Carbohydrate-induced Equine Laminitis. *Vet Clin Equine.*, v. 26, p. 79-94, 2010.

MILINOVICH, G.J.; TROTT, D.J.; BURRELL, P.C. et al., Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis.

*Environmental Microbiology.*, v. 8 n. 5, p. 885-898, 2006.

MINNICK, P.D.; BROWN, C.M.; BRASELTON, W.E. et al., The induction of equine laminitis with an aqueous extract of the heartwood of black walnut (*Juglans nigra*). *Vet Hum Toxicol.*, v. 29, n. 3, p. 230-233, 1987.

MORICONI, A.; CESTA, M.C.; CERVELLERA, M.N., et al. Design of Noncompetitive Interleukin-8 Inhibitors Acting on CXCR1 and CXCR2. *J. Med. Chem.* v.50, p. 3984-4002, 2007.

MUKAIDA, N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, v. 284, p. 566-577, 2003.

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

MURPHY, P. M., BAGGIOLINI, M., CHARO, I. F., et al. International union of pharmacology: XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.*, v. 52, n 1, p. 145-176, 2000.

NEUDER, L.E.; KEENER, J.M.; ECKERT, R.E. et al., Role of p38 MAPK in LPS induced pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in equine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 129, p. 192-199, 2009.

NIETO, J.E.; MACDONALD, M.H.; BRAIM, A.E. et al., Effect of lipopolysaccharide infusion on gene expression of inflammatory cytokines in normal horses in vivo. *Equine Vet. J.*, v. 41, p. 717-719, 2009.

NOSCHKA, E.; VANDENPLAS, M.L.; HURLEY, D.J. et al., Temporal

aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 129, p.242-53, 2009.

NOURIAN, A.R.; ASPLIN, K.E.; MCGOWAN, C.M. et al., Equine laminitis: ultrastructural lesions detected in ponies following hyperinsulinaemia. *Equine Vet J.*, v. 41, n. 7, p. 671-677, 2009.

PASS, M.A.; POLLITT, S.; POLLITT, C.C. Decreased glucose metabolism causes separation of hoof lamellae in vitro: a trigger for laminitis? *Equine Vet J Suppl.*, v. 26, p. 133-138, 1998.

PERONI, J.F.; MOORE, J.N.; NOSCHKA, E. et al., Predisposition for venoconstriction in the equine laminar dermis: implications in equine laminitis. *J Appl Physiol.*, v. 100, n. 3, p. 759- 763, 2006.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R.P. Minireview: secondary beta-cell failure in type 2 diabetes-a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology.*, v. 143, p. 339-342, 2002.

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

POLLITT, C.C. Conferência Anual da ABRAVEQ, 8, 2007, São Paulo. The horse's foot – the inside story. São Paulo, ABRAVEQ, 2007, 29 p. Disponível em: [www.abraveq.com.br](http://www.abraveq.com.br). Acesso em: 04/12/2012.

POLLITT, C.C. Conferência Anual da ABRAVEQ, 8, 2007, São Paulo. Laminitis Theory. Shots around the target. São Paulo, ABRAVEQ, 2007, 15 p. Disponível em: [www.abraveq.com.br](http://www.abraveq.com.br). Acesso em: 04/12/2012.

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

POLLITT, C.C.; VISSER, M. B. Carbohydrate Alimentary Overload Laminitis. *Vet Clin Equine.*, v.26, p. 65-78, 2010.

RADIN, M.J.; SHARKEY, L.C.; HOLYCROSS, B.J. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Vet Clin Pathol.*, v. 38, n.2, p. 136-56, 2009.

RAINER, G. E., FISHER, A. C., NASH, G. B. Endothelial-borne plateletactivating factor and interleukin-8 rapidly immobilize rolling neutrophils. *Am J Physiol*, v. 272, p. 114–122, 1997

SALANGA, C.L.; HANDEL T.M. Chemokine Oligomerization and Interactions with Receptors and Glycosaminoglycans: The Role of Structural Dynamics in Function. *Exp Cell Res.* v. 10; n. 317, p. 590–601, 2011.

STEWART, A.J.; PETTIGREW, A.; COCHRAN, A.M. et al.,. Indices of inflammation in the lung and liver in the early stages of the black walnut extract model of equine laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 129(3-4), p. 254-260, 2009.

THOEFNER, M.B.; POLLITT, C.C.; VAN EPS, A.W. et al., Acute bovine **laminitis**: a new induction model using alimentary oligofructose overload. *J Dairy Sci.*, v. 87, n. 9, p. 2932-2940, 2004.

THOEFNER, M.B.; WATTLE, O.; POLLITT, C.C. et al., Histopathology of oligofructose-induced acute **laminitis** in

heifers. *J Dairy Sci.*, v. 88, n. 8, p. 2774-2782, 2005.

TREIBER, K.H.; KRONFELD, D.S.; HESS, T.M. et al.,. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 228, p. 1538–1545, 2006.

TREIBER, K.; CARTER, R.; GAY, L. et al.,. Inflammatory and redox status of ponies with a history of pasture-associated laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v.129, p. 216-220, 2009.

USDA-NAHMS. Lameness and laminitis in US horses. In: United States Department of Agriculture National Animal Health Monitoring System, April 2000.

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

VICK, M.M.; ADAMS, A.A.; MURPHY B.A. et al.,. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *J Anim Sci.*, v. 85, n. 5, p. 1144–1155, 2007.

VILLA, P.; TRIULZI, S.; CAVALIERI, B. et al. The Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) Receptor Inhibitor Reparixin Improves Neurological Deficits and Reduces Long-term Inflammation in Permanent and Transient Cerebral Ischemia in Rats. *Mol Med*, v.13, n. 3-4, p. 125-133, 2007.

VISSER, M.B.; POLLITT, C.C. The timeline of metalloprotease events during oligofructose induced equine laminitis development. *Equine Vet. J.* v. 44, p. 88-93, 2012.

WOODMAN, L.; SUTCLIFFE, A.; KAUR D. et al., Chemokine concentrations and mast cell chemotactic activity in BAL fluid in patients with eosinophilic bronchitis and

asthma, and in normal control subjects.  
*Chest.*, v. 130, n. 2, p. 371-378, 2006.

ZARBOCK, A.; ALLEGRETTI, M.; LEY, K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. *Br J Pharmacol.*, v. 155, n. 3, p. 357-364, 2008.

## CAPÍTULO 2

### **Sinais clínicos e hematológicos de equinos submetidos ao modelo de laminite induzida por oligofrutose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2**

Leonardo R. de Lima<sup>2</sup>, Heloisa M.F. Mendes<sup>2</sup>, Jessica F. Magalhães<sup>2</sup>, Ludmila Markowitz<sup>2</sup>, Carolina B. Cavalcanti<sup>2</sup>, Fabíola O. Paes Leme<sup>2</sup>, Mauro M Teixeira<sup>3</sup>, Rafael R. Faleiros<sup>2</sup>,

### **RESUMO**

O recrutamento de leucócitos aos tecidos é uma parte essencial da resposta imune inata e esse processo de forma desregulada pode resultar em lesões nos tecidos. Assim, a infiltração de leucócitos tem sido implicada na patogênese da laminite aguda em equinos. Os objetivos desta pesquisa foram: verificar a tolerância de equinos à aplicação de um antagonista alostérico de CXCR1 e CXCR2 (reparixina) pela via intravenosa e verificar sua ação sobre os sinais clínicos e parâmetros hematológicos de cavalos com endotoxemia e laminite induzida por oligofrutose. Doze equinos sem raça definida de origem brasileira receberam oligofrutose (10 g/kg de peso vivo PO no tempo 0) e foram divididos em dois grupos: tratados (30 mg/kg pv de reparixina IV, nos tempos 6, 12, 18 e 24 h) e não tratados. As frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal, coloração de membranas mucosas, presença e intensidade de pulso digital, sensibilidade ao exame com pinça de casco e grau de claudicação segundo Obel, bem como parâmetros hematológicos e bioquímicos (hemograma, glicose, uréia, creatinina, ALT, AST, FA, GGT, bilirrubina total e proteína total) foram aferidos nos tempos 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. O modelo usando oligofrutose foi adequado para induzir sinais de laminite e endotoxemia, como diarreia, febre e leucocitose em cavalos sem raça definida de origem nacional. Também, não foram observadas quaisquer reações adversas clínicas ou hematológicas relacionadas ao uso intravenoso da reparixina. Contudo essa substância, quando administrada na dose de 30 mg/kg de pv, a cada 6 horas, por quatro aplicações, não foi capaz de prevenir os sinais clínicos e as alterações hematológicas causadas pela endotoxemia na espécie equina. Novos estudos usando biópsias de casco deverão ser conduzidos de forma a verificar possível efeito benéfico da reparixina sobre o tecido lamelar.

Palavras chave: cavalos, laminite, neutrófilos, quimiocinas, reparixina.

### **ABSTRACT**

*Leucocytes recruitment to tissues is an essential part of the innate immune response and an unregulated process can result in tissue damage. Thus, leucocytes infiltration has been implicated in the pathogenesis of acute laminitis. The objectives of this study were to determine the tolerance of horses to the intravenous infusion of reparixin, an antagonist for CXCR1/2 (a chemokine receptor for neutrophils attraction) and these effects on the clinical signs and hematological parameters in horses given oligofrutose to induce endotoxemia and laminitis.*

*Twelve horses were given oligofructose (10g/kg bw PO) in time 0 and divided in two groups: treated (30 mg/kg bw. Reparixin IV, times 6, 12, 18 e 24 h) and no treated. Cardiac and respiratory frequency, rectal temperature, mucous membrane colour, digital pulse, hoof sensitivity and Obel's grade of lameness were recorded. Values for RBC, WBC, glycosis, BUN, creatinin, ALT, AST, alcalin phosphatase, GGT, total bilirubin and serum protein were measured on times 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 e 72 h. All the horses given oligofructose developed signs of endotoxemia like diarrhea, fever and leukocytosis. Also, CXCR1/2 antagonist treatment did not cause any adverse effects. However, this substance when injected intravenously (30mg/kg) 6/6 hours for 4 applications, did not ameliorate clinical and hematological signs of endotoxemia. Further studies using hoof biopsies are granted to test a possible beneficial effect in lamellar tissue.*

*Key words: horse, laminitis, neutrophils, chemokine, reparixin.*

## INTRODUÇÃO

O recrutamento de neutrófilos ao tecido inflamado é uma parte essencial da resposta imune inata. Além disso, a liberação de mediadores químicos a partir de um foco inflamatório localizado é capaz de promover a ativação e a infiltração de leucócitos em órgãos distantes da lesão original (Faleiros et al. 2008). Dessa maneira, leucócitos desempenham um papel central na injúria tecidual em várias doenças e estão intimamente relacionados à falência orgânica durante a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica – SIRS (Belknap et al. 2007).

A ativação sistêmica de leucócitos e a migração dessas células para o interstício têm sido demonstradas nas lamelas do casco e em outros órgãos de cavalos durante a fase de desenvolvimento da laminite (Black et al. 2006, Faleiros et al. 2008). Assim, inflamação sistêmica semelhante à SIRS, prévia ao desenvolvimento da falência de órgãos, parece preceder a falência lamelar em cavalos (Hurley et al. 2006, Belknap et al. 2007, Loftus et al. 2007a, Loftus et al. 2007b, Stewart et al. 2009).

CXCL8 ou Interleucina 8 (IL-8) é um membro da subfamília CXC das quimiocinas

e é uma potente substância atrativa para neutrófilos. Sua ação é mediada por receptores CXCR1 e CXCR2 acoplados a proteína G (GPCRs), que têm alta afinidade por quimiocinas glutamina-leucina-arginina positivas (Mukaida 2003, Kim et al. 2011). A IL-8 tem sido detectada em vários tecidos humanos acometidos por condições inflamatórias como psoríase (Giustizieri et al. 2001), asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (Woodman et al. 2006), todas condições associadas com grave infiltração neutrofílica. De forma semelhante, no cavalo, desafios antigênicos levam ao aumento da expressão de IL-8 e seu respectivo mRNA nos pulmões de animais acometidos por doença pulmonar crônica e obstrução recorrente de vias aéreas, condições também associadas a forte infiltração neutrofílica (Franchini et al. 2000, Ainsworth et al. 2006). A IL-8 também tem sido implicada na patogênese da endotoxemia equina. Endotoxinas foram capazes de aumentar a expressão de IL-8 nos neutrófilos *in vitro* (Neuder et al. 2009) e no sangue quando injetadas sistemicamente (Nieto et al. 2009). Além disso, o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8), no estágio de desenvolvimento da laminite, indica que a presença de quimiocinas atrativas de

leucócitos (principalmente IL-8) pode desempenhar importante papel na migração leucocitária nos eventos iniciais da laminite (Belknap et al. 2007, Faleiros et al. 2009a, 2011b).

Dessa forma, a IL-8 é uma molécula fundamental para a migração e ativação de neutrófilos em órgãos danificados pela SIRS. O bloqueio farmacológico seletivo de IL-8 representa um promissor horizonte no controle das lesões de origem inflamatória com potencial para o tratamento e prevenção da laminite equina (Bizzarri, et al. 2006, Coelho et al. 2008). O antagonista de CXCR1/CXCR2 usado neste experimento (reparixina) é um antagonista alostérico não competitivo que inibe o padrão de sinalização intracelular sem afetar a capacidade de ligação do receptor. Assim, a reparixina potencialmente inibe uma grande variedade de atividades biológicas induzidas por IL-8 (Souza et al. 2004, Bizzarri, et al. 2006, Gorio et al. 2007, Zarbock, et al. 2008, Marsh e Flemming, 2011). Apesar das recentes evidências da participação de leucócitos na origem da laminite (Fontaine et al. 2001, Belknap et al. 2007, Faleiros et al. 2009a, 2009b, Faleiros et al. 2011, Lunn e Hurley, 2009) e do potencial terapêutico de reparixina na migração de neutrófilos, nenhum estudo com essa droga havia sido conduzido na espécie equina.

Os objetivos dessa pesquisa foram verificar a tolerância de equinos à aplicação de reparixina pela via intravenosa e verificar sua ação sobre os sinais clínicos e parâmetros hematológicos de cavalos com endotoxemia induzida por oligofrutose em um modelo de laminite aguda.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de ética sobre experimentação animal da

UFMG (CETEA/UFMG 225/2009). Foram utilizados doze equinos sem raça definida (quatro machos e oito fêmeas, idade média de  $7 \pm 3,5$  anos, pesando  $305 \pm 35$  kg, escore corporal  $5 \pm 1$ ), sem histórico prévio de claudicação relacionada aos cascos e previamente adaptados por 2 semanas ao confinamento em baia e a uma dieta exclusiva à base de feno de gramínea (*Cynodum sp.*). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, não tratado (n=6) e tratado (n=6). No tempo considerado zero (T0), todos os animais receberam 10 g/kg de peso vivo de oligofrutose (Raftilose P95 – Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda) diluídos em 3 litros de água, via sonda naso-gástrica (van Eps e Pollit, 2006). Nos tempos 6, 12, 18 e 24 horas, os animais do grupo tratado receberam, por infusão intravenosa durante 10 minutos, 30 mg/kg (Souza et al. 2004) de peso vivo de reparixina base diluídos em 500 ml de salina estéril 0,9% e filtrados em filtro bacteriológico de  $0,22\mu\text{m}$  (Biofil syringe filter, Jet Biofil, www.jetbiofil.com).

Nos tempos 0, 12, 36 e 72 horas, 3 biópsias de cada casco foram coletadas sequencialmente no membro posterior esquerdo (T0), posterior direito (T12), anterior direito (T36) e anterior esquerdo (T72). As biópsias tiveram como objetivo um estudo paralelo sobre histologia e biologia molecular.

Os animais foram monitorados clinicamente nos tempos 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal, coloração de membranas mucosas, presença e intensidade de pulso digital, presença e intensidade dos sons intestinais, sensibilidade ao exame com pinça de casco e grau de claudicação

segundo Obel (1948) citado por Pollit (1996).

Após o exame clínico, amostras de sangue foram coletadas pela punção da veia jugular, acondicionadas em três tubos distintos (sem anticoagulante, com ácido etileno-diamino-tetracético - EDTA e com fluoreto) e refrigeradas imediatamente até a realização de hemograma e separação de soro e plasma.

As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas por 5 min, a 3000 G até completar a separação da fração líquida (soro), que foi armazenada em freezer a -18°C. As amostras congeladas foram submetidas às análises bioquímicas em no máximo sete dias.

As seguintes análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas: hemograma, glicose, uréia, creatinina, lactato, CK, ALT, AST, FA, GGT, bilirrubina total e proteína total. Para determinação do volume globular (VG) foi utilizada a técnica de micro-hematócrito com centrifugação durante 10 min a 10000 rpm. A concentração de proteína plasmática total foi determinada por refratometria. A contagem das células sanguíneas foi realizada em aparelho automático através da técnica de impedância elétrica (ABACUS JUNIOR VET). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com panótico, avaliando-se 100 células. Para mensuração da glicemia foram utilizadas amostras de plasma em fluoreto, obtidas após centrifugação. Para todas as variáveis bioquímicas foram utilizados kits comerciais da marca Synermed®. Todas as análises bioquímicas foram realizadas em aparelho espectrofotométrico automático (Cobas-Mira Plus).

Os dados foram submetidos à análise pelo programa Prism 5 for Windows (version 5.00 Trial, March 2007), utilizando o teste de normalidade *KS normality test* e análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Student Newman Keuls para comparação de médias considerando-se dados paramétricos. Para dados não paramétricos usou-se o teste de Mann Whitney para comparação de tratamentos entre tempos e o teste de Friedmann para comparar tempos em cada grupo. Para todas as análises utilizou-se um nível de significância de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

A análise separada dos grupos não demonstrou nenhuma alteração significativa do tratamento ao longo dos tempos avaliados. Dessa forma, optou-se pela avaliação de todos os animais (tratados e não tratados) em conjunto. Foi observado aumento da frequência cardíaca nos tempos 36 e 48 horas (Figura 1)

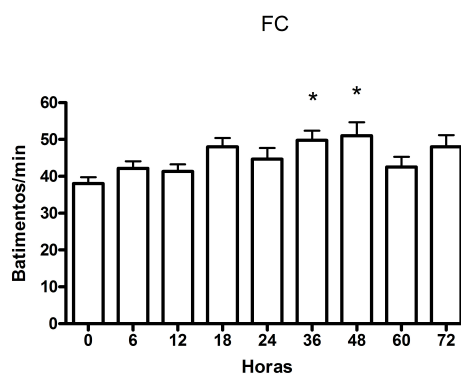


Figura 1. Variação na frequência cardíaca em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $p < 0,05$ ).

Entretanto não foi observada alteração da frequência respiratória em nenhum dos dois

grupos. Com 24 e 36 horas, houve elevação da temperatura retal (Figura 2) e a partir de 36 horas foi observado aumento do escore de claudicação segundo Obel que se manteve até o fim do experimento (Fig 3).

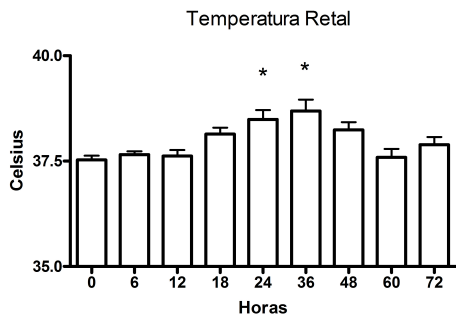


Figura 2. Variação na temperatura retal em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $p < 0,05$ ).

Com relação à sensibilidade do casco ao exame de pinça, nenhum animal apresentou sinal positivo. A presença de pulso digital apareceu entre 18 e 24 horas e permaneceu até o fim do experimento. Diarréia foi um sinal clínico presente em todos os animais e teve início às 12 horas, terminando às 48 horas. A maioria dos animais estava com diarréia às 24 (10/12) e 36 horas (9/12). Congestão de mucosa foi notada em todos os animais entre 24 e 48 horas e metade manteve a congestão até o fim do experimento. A maioria dos animais apresentou motilidade intestinal normal durante todo o experimento com um aumento coincidindo com o período de diarréia. Contudo, dois animais apresentaram hipomotilidade entre 36 e 48 horas. Metade dos animais permaneceu por longos períodos em decúbito e foram inapetentes durante o período de diarréia.

As principais alterações hematológicas observadas foram o aumento da contagem leucocitária 48 horas após a indução (Figura

4), elevação no hematócrito no tempo 18 horas e diminuição ao final do experimento (72 horas) (Figura 5), diminuição na contagem de hemácias e nos níveis de hemoglobina no tempo 72 horas (Figura 6),

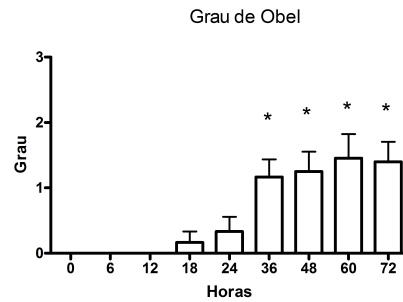


Fig 3. Variação no grau de claudicação segundo Obel (1948 em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $p < 0,05$ ).

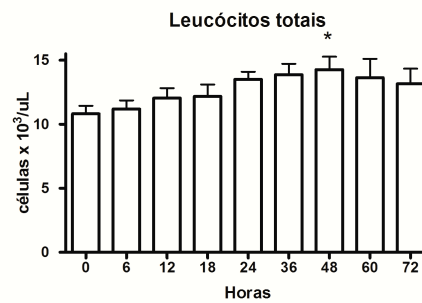


Fig 4. Variação na leucometria em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $p < 0,05$ ).

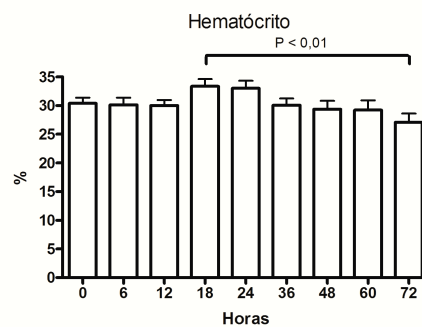


Figura 5. Variação no hematócrito em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $p < 0,05$ ).

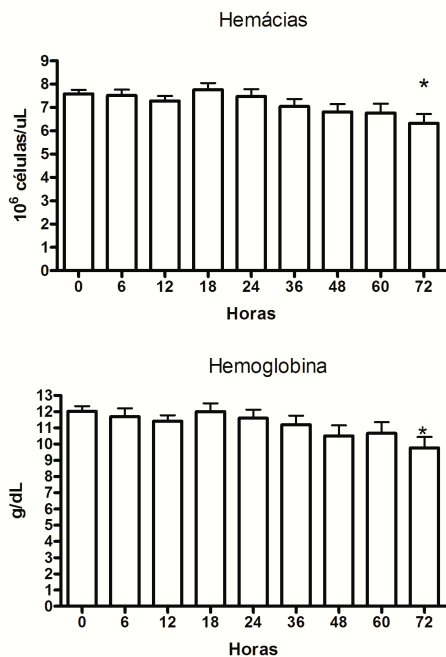


Figura 6. Variação na contagem de hemácias totais e concentração de hemoglobina em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $P<0,05$ ).

Não houve alterações significativas nas variáveis proteínas totais e contagem de plaquetas.

Uma elevação significativa na glicemia ocorreu no tempo 36 horas ( $p<0.001$ ). (Figura 7). Houve um aumento significativo da creatinina sérica no tempo 36 horas. Por outro lado, houve uma redução da uréia no tempo 18 horas com recuperação dos níveis anteriores no tempo 60 horas (Figura 8).

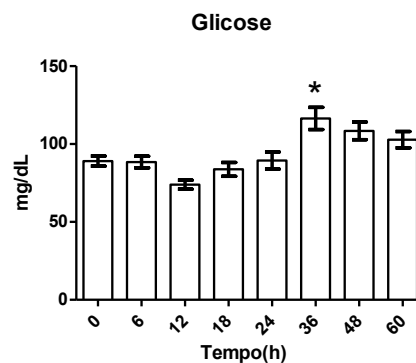


Figura 7. Variação nos níveis de glicose em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $P<0,05$ ).

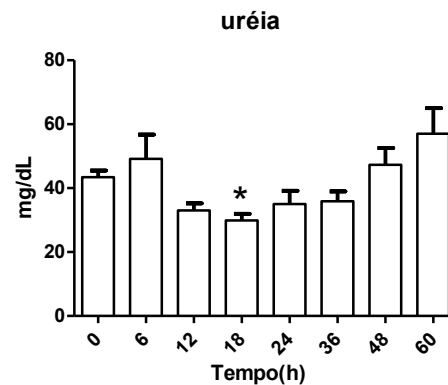
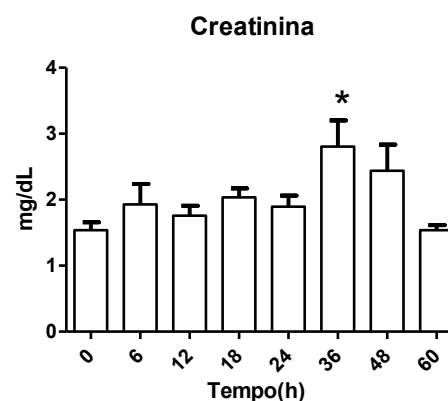


Figura 8. Variação nos níveis de creatinina e uréia em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $P<0,05$ ).

Novamente, no tempo 36 horas houve elevação nos níveis de ALT e bilirrubina total com persistência da hiperbilirrubinemia no tempo 48 horas (Figura 9). Nas outras variáveis bioquímicas (lactato, albumina,

GGT, FA, AST, CK) não houve alterações significativas.

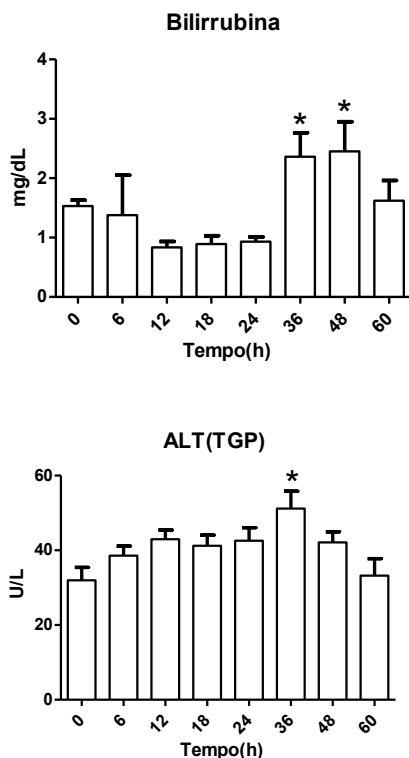


Figura 9. Variação nos níveis de ALT e Bilirrubina em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Todos os cavalos utilizados neste estudo desenvolveram sinais compatíveis com endotoxemia (febre, leucocitose, diarreia e mucosas congestionadas) e laminite, confirmando a validade do modelo experimental. De fato, a dose de 10 g/kg de peso vivo de oligofrutose (Raftlose P95), usada neste experimento, tem sido preconizada como padrão para indução de laminite em equinos (van Eps e Pollitt, 2006, Visser e Pollitt, 2011, Visser e Pollitt, 2012, van Eps et al. 2012). Contudo, a utilização da reparixina na dose de 30mg/kg de pv administrados a cada

6 horas por 4 aplicações não foi capaz de impedir o desenvolvimento dos sinais de endotoxemia e de laminite.

O aumento da frequência cardíaca coincidiu com o período de diarreia, podendo ser uma resposta compensatória à hipovolemia ou uma manifestação de desconforto apresentado pelos animais. Além disso, a endotoxemia provocada pelo modelo de indução de laminite pode por si mesma, elevar a frequência cardíaca. O aumento da temperatura no período precedente ao aumento da frequência cardíaca também sugere a presença de endotoxemia (van Eps e Pollitt, 2006). O aumento da motilidade intestinal no mesmo período da diarreia indica o aumento da passagem da ingesta e, possivelmente, propiciou o aparecimento de espasmos responsáveis pelo desconforto abdominal. Por outro lado não houve alteração da frequência respiratória e dos níveis de lactato, sugerindo que o quadro de diarreia não foi capaz de alterar o equilíbrio ácido-base.

Os sinais de claudicação foram observados a partir de 36 horas da indução com oligofrutose, corroborando a observação do início dos sinais de laminite em tempo semelhante no modelo proposto por van Eps & Pollitt (2006). Contudo, o grau de claudicação visto neste estudo foi aquém do observado pelos outros autores, mesmo com a possibilidade de as lesões provocadas pelos procedimentos de biópsia poderem ter aumentado o grau de claudicação. Especula-se sobre a influência do peso dos animais, uma vez que se utilizaram animais trotadores americanos no primeiro estudo, embora não mencionado pelos autores, o peso médio dessa raça é em torno de 450 kg. O peso médio dos animais em nosso experimento foi de 305 kg. Outra consideração é o fato dos animais poderem apresentar um fenótipo

metabólico diferente da outra raça estudada e dessa forma reagirem de forma mais branda a um desafio semelhante com oligofrutose. Considera-se ainda que a hemorragia provocada pela coleta de biópsias possa ter promovido a perda de elementos capazes de induzir a laminite (padrões moleculares associados a patógenos ou ao dano tecidual, PAMPs e DAMPs respectivamente). Da mesma forma, a hemorragia pode ter provocado a perda do fármaco (reparixina), atenuando seus efeitos.

A fase de desenvolvimento da laminite é considerada como o período entre o aparecimento do fator desencadeante e o início da claudicação. A fase aguda é o período desde o aparecimento da claudicação até 72 horas ou o início da rotação da falange distal (Pollitt, 2007). Na fase de desenvolvimento e na fase aguda da laminite contempladas nesse experimento, as lesões se concentram na porção submural do estojo córneo, não havendo comprometimento do córium solear. Assim, devido à natureza mais maleável da sola em comparação com a muralha, a pressão exercida pela pinça de casco tende a deformar somente a sola, poupando as áreas comprometidas pelas lesões iniciais da laminite aguda. Dessa forma, a sensibilidade da sola ao exame com pinça de casco ocorre somente quando há isquemia provocada pelo deslocamento palmar da falange distal e pode, dessa forma, estar ausente nas fases iniciais da laminite.

Outro achado consistente observado no modelo de indução utilizado foi a presença de diarreia em todos os animais entre 12 e 48 horas. A duração de até 48 horas foi maior que a observada no grupo de animais recebendo a mesma quantidade de oligofrutose (10g/kg) no experimento original (van Eps e Pollitt, 2006). O influxo osmótico de água para o lume intestinal

associado ao desequilíbrio da microbiota pela alteração do pH, ambos provocados pela chegada abrupta de grandes quantidades de oligossacarídeos ao ceco e cólon, foi a causa provável da diarreia (Moore et al. 1981, Clarke et al. 1982, Milinovich et al. 2006, Milinovich et al. 2010). Nesse mesmo período, observou-se inicialmente uma queda no nível plasmático de uréia o que pode refletir a perda de amônia pela diarreia. Posteriormente observou-se um aumento no nível de creatinina plasmática, sugerindo queda na perfusão renal devido à hipovolemia provocada pela diarreia.

O sequestro de grande quantidade de fluidos no lume intestinal e o aumento do tônus simpático devido ao desconforto provocado pela laminite deveriam ter ocasionado hemoconcentração significativa entre 18 e 36 horas. Contudo, a coleta de biópsia em três pontos de cada casco levou a grande perda sanguínea, o que pode ter atenuado a elevação do hematócrito e proteína total e mesmo levado à queda do hematócrito ao final do experimento.

As lesões da mucosa intestinal pelos produtos ácidos da fermentação da oligofrutose permitem a absorção de endotoxinas que estimulam a produção de leucócitos (Milinovich et al. 2006, Belknap, 2010), justificando o aparecimento de leucocitose no tempo 48 horas. Embora os animais desenvolvessem sinais sistêmicos compatíveis com endotoxemia (febre, diarreia e mucosas congestionadas) e SIRS, uma esperada leucopenia inicial não foi observada. Em geral, sinais graves de SIRS cursam com leucopenia em várias situações clínicas assim como na laminite induzida pelo fornecimento de extrato de noqueira preta (*Juglans nigra*). Contudo, leucopenia não tem sido observada em cavalos

submetidos à sobrecarga com carboidratos (Faleiros et al. 2011a)

O desenvolvimento de hiperglicemia no tempo 36 horas corrobora os achados de um estudo anterior onde foram observados elevações nos níveis de glicose e insulina no mesmo período (van Eps e Pollitt 2006). Apesar dos produtos da fermentação servirem como fonte energética após absorvidos, é pouco provável que o aumento da glicemia tenha alguma ligação direta com esse evento. Por outro lado, tem sido demonstrada uma considerável elevação nos níveis de cortisol precedendo a elevação da glicose no mesmo modelo (van Eps e Pollitt, 2006). Dessa maneira, é provável que a hiperglicemia transitória observada nesse experimento seja atribuída aos efeitos diabetogênicos do cortisol e não à absorção de ácidos graxos voláteis no intestino grosso seguida de neoglicogênese no fígado (Mackay, 1992, Moore e Barton, 2003)

O aumento da transaminase ALT às 36 horas e da bilirrubina com 36 e 48 horas são compatíveis com lesão hepatocelular. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os animais tratados e não tratados com reparixina, sugerindo que as alterações hepáticas foram causadas pela endotoxemia e não por toxicidade da droga. A inapetência exibida por animais febris e a hemoconcentração devido à diarreia podem ter contribuído para a elevação da bilirrubina e ALT (Mackay, 1992, Moore e Barton, 2003).

### CONCLUSÃO

Não foram observadas quaisquer reações adversas clínicas ou hematológicas relacionadas ao uso intravenoso da substância reparixina. Contudo essa, quando administrada na dose de 30 mg/kg de peso

vivo, 4 vezes ao dia, por 4 aplicações, não foi capaz de prevenir os sinais clínicos e as alterações hematológicas causadas pela endotoxemia na espécie equina. Dessa forma, estudos adicionais utilizando outras doses e outros regimes de tratamento devem ser conduzidos uma vez que o fármaco tem sido eficaz em outras espécies.

### REFERÊNCIAS

AINSWORTH, D.M.; WAGNER, B.; FRANCHINI, M. et al. Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.*, v. 67, n. 4, p. 669-677, 2006.

BELKNAP, J.K. Black walnut extract: an inflammatory model. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, v. 26, n.1, p. 95-101, 2010.

BELKNAP, J.K.; GIGUÈRE, S.; PETTIGREW, A. et al. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. *Equine Vet J.*, v. 39, n. 1, p. 42-7, 2007.

BIZZARRI, C.; BECCARI, A.R.; BERTINI, R. et al. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharm Ther.*, v. 112, p. 139-149, 2006.

BLACK, S.J.; LUNN, D.P.; YIN, C. et al. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n.109 (1-2), p. 161-166, 2006.

CLARKE, L.L.; GARNER, H.E.; HATFIELD, D. Plasma volume, electrolyte, and endocrine changes during onset of

- laminitis hypertension in horses. *Am. J.vet. Res.*, v. 43, p. 1551-1555, 1982.
- COELHO, F.M.; PINHO, V.; AMARAL, F.A. et al. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum.*, v. 58, n. 8, p. 2329-2337, 2008.
- FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.J. et al. Laminar Leukocyte Accumulation in Horses with Carbohydrate Overload-Induced Laminitis. *J Vet Intern Med.*, v. 25, p. 107-115, 2011.
- FALEIROS, R.R.; LEISE, B.S.; WATTS, M. et al. Laminar chemokine mRNA concentrations in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 144(1-2), p. 45-51, 2011.
- FALEIROS, R.R.; LEISE, B.B.; WESTERMAN, T. et al. In vivo and in vitro evidence of the involvement of CXCL1, a keratinocyte-derived chemokine, in equine laminitis. *J Vet Intern Med.*, v. 23, n. 5, p. 1086-96, 2009.
- FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G.; ALVES, G.E. et al. Local and remote lesions in horses subjected to small colon distension and decompression. *Can J Vet Res.*, v. 72, n. 1, p. 68-76, 2008.
- 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. *J Vet Intern Med.*, v. 23, n.1, p. 174-181, 2009.
- FONTAINE, G.L.; BELKNAP, J.K.; ALLEN, D. et al. Expression of interleukin-1beta in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. *Am J Vet Res.*, v. 62, n. 5, p. 714-720, 2001.
- FRANCHINI, M.; GILL, U.; VON FELLEBERG, R. et al. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res.*, v. 61, n. 11, p. 1369-1374, 2000.
- GIUSTIZIERI, M.L.; MASCIA, F.; FREZZOLINI, A. et al. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 107, p. 871-877, 2001.
- GORIO, A.; MADASCHI, L.; ZADRA, G. et al. Reparixin, an Inhibitor of CXCR2 Function, Attenuates Inflammatory Responses and Promotes Recovery of Function after Traumatic Lesion to the Spinal Cord. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.*, v. 322, n. 3, p. 972-981, 2007.
- HURLEY, D.J.; PARKS, R.J.; REBER, A.J. et al. Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 110(3-4), p. 195-206, 2006.
- KIM, H.Y.; CHOI, J.H.; KANG, Y.J. et al. Reparixin, an inhibitor of CXCR1 and CXCR2 receptor activation, attenuates blood pressure and hypertension-related mediators expression in spontaneously hypertensive

rats. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 34, n. 1, p. 120-127, 2011.

LOFTUS, J.P.; BELKNAP, J.K.; STANKIEWICZ, K.M. et al. Laminar xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the prodromal stage of black-walnut induced equine laminitis. *Equine Vet J.*, v. 39, n. 1, p. 48-53, 2007.

LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; PETTIGREW, A. et al. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut- induced laminitis. *Am J Vet Res.*, v. 68, n. 11, p. 1205-1211, 2007.

LUNN, D.P.; HURLEY, D.J. The role of leukocyte biology in laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 129(3-4), p. 158-160, 2009.

MACKAY, R.J. Endotoxemia. In: ROBINSON, N.E. Current therapy in equine medicine. 3. ed. Philadelphia:W. B. Saunders. p. 225-232, 1992.

MARSH, D.R.; FLEMMING, J.M. Inhibition of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptors attenuates acute inflammation, preserves gray matter and diminishes autonomic dysreflexia after spinal cord injury. *Spinal Cord.*, v. 49, n. 3, p. 337-344, 2011.

MILINOVICH, G.J.; KLIEVE, A.V.; POLLITT, C.C. et al. Microbial Events in the Hindgut During Carbohydrate-induced Equine Laminitis. *Vet Clin Equine.*, v. 26, p. 79-94, 2010.

MILINOVICH, G.J.; TROTT, D.J.; BURRELL, P.C. et al. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis.

*Environmental Microbiology.*, v. 8 n. 5, p. 885-898, 2006.

MOORE J.N.; BARTON M.H. Treatment of endotoxemia. *Vet Clin North Am Equine Pract.* v. 19, n.9, p. 681-695, 2003.

MOORE, J.N.; GARNER, H.E.; COFFMAN, J.R. Haematological changes during development of acute laminitis hypertension. *Equine vet.*, v. 13, p. 240-242, 1981.

MUKAIDA, N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, v. 284, p. 566-577, 2003.

NEUDER, L.E.; KEENER, J.M.; ECKERT, R.E. et al. Role of p38 MAPK in LPS induced pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in equine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 129, p. 192-199, 2009.

NIETO, J.E.; MACDONALD, M.H.; BRAIM, A.E. et al. Effect of lipopolysaccharide infusion on gene expression of inflammatory cytokines in normal horses in vivo. *Equine Vet. J.*, v. 41, p. 717-719, 2009.

POLLITT, C.C. Conferência Anual da ABRAVEQ, 8, 2007, São Paulo. Laminitis Theory. Shots around the target. São Paulo, ABRAVEQ, 2007, 15 p. Disponível em: [www.abraveq.com.br](http://www.abraveq.com.br). Acesso em: 04/12/2012.

SOUZA, D.G.; BERTINI, R.; VIEIRA, A. et al. Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol.*, v. 143, p. 132-142, 2004.

- STEWART, A.J.; PETTIGREW, A.; COCHRAN, A.M. et al. Indices of inflammation in the lung and liver in the early stages of the black walnut extract model of equine laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 129(3-4), p. 254-260, 2009.
- VAN EPS, A. W.; POLLITT, C.C. Equine laminitis induced with oligofructose. *Equine vet. J.*, v. 38, n. 3, p. 203-208, 2006.
- VAN EPS A.W., LEISE B.S., WATTS M., et al. Digital hypothermia inhibits early lamellar inflammatory signalling in the oligofructose laminitis model. *Equine Vet J.* v.44, n.2, p.230-237, 2012
- VISSER M.B., POLLITT C.C. Lamellar leukocyte infiltration and involvement of IL-6 during oligofructose-induced equine laminitis development. *Vet Immunol Immunopathol.* v.144, n(1-2), p. 120-128, 2011.
- VISSER M.B., POLLITT C.C. The timeline of metalloprotease events during oligofructose induced equine laminitis development. *Equine Vet J.*, v.44, n.1, p. 88-93, 2012.
- WOODMAN, L.; SUTCLIFFE, A.; KAUR D. et al. Chemokine concentrations and mast cell chemotactic activity in BAL fluid in patients with eosinophilic bronchitis and asthma, and in normal control subjects. *Chest.*, v. 130, n. 2, p. 371-378, 2006.
- ZARBOCK, A.; ALLEGRETTI, M.; LEY, K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. *Br J Pharmacol.*, v. 155, n. 3, p. 357-364, 2008.

### CAPÍTULO 3

#### **Alterações histológicas e imunohistoquímicas das lamelas do casco de equinos submetidos ao modelo de laminite induzida por oligofrutose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2**

Leonardo R. de Lima<sup>2</sup>, Heloisa M.F. Mendes<sup>2</sup>, Jessica F. Magalhães<sup>2</sup>, Ludmila Markowitz, Carolina B. Cavalcanti<sup>2</sup>, Fabíola O. Paes Leme<sup>2</sup>, Mauro M Teixeira, Rafael R.Faleiros<sup>2</sup>,

#### **RESUMO**

Os receptores CXCR1 e CXCR2 acoplados a proteína G (GPCRs) têm alta afinidade por quimiocinas glutamina-leucina-arginina positivas (CXC ERL+) e tem como característica comum a habilidade de recrutar neutrófilos ao tecido inflamado. O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8) no estágio de desenvolvimento da laminite, indica que a presença de quimiocinas atrativas de leucócitos pode desempenhar importante papel na migração leucocitária nos eventos iniciais da laminite. O bloqueio seletivo dos receptores CXCR1 e CXCR2 como alvo terapêutico ainda não foi avaliado na laminite equina. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação de um antagonista de CXCR1 e CXCR2 sobre as lesões histológicas iniciais e sobre a infiltração leucocitária no tecido lamelar na laminite induzida por oligofrutose. Doze equinos receberam oligofrutose (10g/kg de pv PO no tempo 0 e foram divididos em 2 grupos: tratados (30 mg/kg p.v. de reparixina IV nos tempos 6, 12, 18 e 24 h) e não tratados. Três biopsias foram colhidas nos tempos 0, 12, 36 e 72 h nos cascos posterior esquerdo, posterior direito, anterior direito e anterior esquerdo, respectivamente. Um escore de 0 a 6 foi aplicado às lesões avaliadas microscopicamente em lamelas coradas por PAS e outro escore de 0 a 5 foi usado para a marcação imunohistoquímica para Calprotectina nas células epidérmicas e nos leucócitos da derme. Não foi possível o estudo do infiltrado leucocitário devido a limitações da técnica de biópsia. A reparixina minimizou as lesões no tecido lamelar.

Palavras chave: cavalos, laminite, neutrófilos, quimiocinas, reparixina.

#### **ABSTRACT**

*CXCR1 e CXCR2 receptors coupled to G protein (GPCRs) have high affinity to glutamin-leucin-arginin positive chemokines (CXC ERL+) and have as common characteristic the ability to recruit neutrofilis to the inflamed tissue. Over expression of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, and IL-8) in the developmental phases indicates that leukocytes attractive chemokines could be involved in the initial events of laminitis. Selective blockage of CXCR1 and CXCR2 receptors as therapeutic target has not been evaluated in equine laminitis. The objective of this research was: to evaluate the effects of a CXCR1/ CXCR2 antagonist drug over the initials microscopic lesions and over the leukocyte infiltrate on lamellar tissue in oligofructose induced laminitis. Twelve horses were given oligofructose (10g/kg bw PO) on time 0 and divided in two groups: treated (30 mg/kg bw. of reparixin IV, times 6, 12, 18 e 24 h) and no treated. Three biopsy samples were taken on times 0,12,36,72 hours on hooves left hind, right hind, right front and left front, respectively. A*

*score from 0 to 6 was applied to lesions in PAS stained slides and 0 to 5 score was applied for calprotectin stain in epidermal cells. The study of leucocytes infiltrate was not possible due technical limitations. In conclusion, reparixin ameliorated the lamellar damage.*

*Keywords: horse, laminitis, neutrophils, chemokine.*

## **INTRODUÇÃO**

Embora os cascos dos equídeos sejam extremamente resistentes às exigências do meio externo, a destruição de sua microestrutura pela laminite tem consequências catastróficas para a sobrevivência do indivíduo acometido. A perda da integridade da junção dermoepidérmica resulta na falta de adesão do casco ao esqueleto, permitindo variados graus de deslocamento entre o estojo córneo e a falange distal, produzindo incapacidade de sustentação do peso e de locomoção. Assim, desde o início das pesquisas com laminite, tem se estabelecido uma forte correlação entre os danos microestruturais e a gravidade dos sinais clínicos (Pollit, 1996).

Apesar do colapso da junção dermoepidérmica ser comum à laminite de variadas etiologias, o evento inicial que deflagra a falência estrutural ainda é pouco compreendido (Katz e Baley 2012). A infiltração de leucócitos a partir da corrente sanguínea e a ativação de leucócitos residentes como parte de um evento à distância associado à inflamação sistêmica (SIRS) têm sido defendidos como hipóteses prováveis (Black et al. 2006, Hurley et al. 2006; Belknap et al. 2007; Loftus et al. 2007, Stewart et al. 2009, Faleiros et al. 2011). O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8), no estágio de desenvolvimento da laminite, indica que a presença de quimiocinas atrativas de leucócitos pode desempenhar importante

papel na migração leucocitária nos eventos iniciais da laminite (Belknap et al. 2007, Faleiros et al. 2009a, Faleiros et al. 2011b). Receptores CXCR1 e CXCR2, acoplados a proteína G (GPCRs), têm alta afinidade por quimiocinas glutamina-leucina-arginina positivas (Mukaida, 2003, Kim et al. 2011). Quimiocinas têm sido detectadas em vários tecidos humanos e equinos afetados por condições inflamatórias associadas com grave infiltração neutrofílica (Franchini et al. 2000, Giustizieri et al. 2001, Woodman et al. 2006, Ainsworth et al. 2006). O bloqueio farmacológico seletivo de CXCR1 e CXCR2 representa um promissor horizonte no controle das lesões de origem inflamatória com potencial para o tratamento e prevenção da laminite equina (Bizzarri, et al. 2006, Coelho et al. 2008).

O antagonista de CXCR1/CXCR2 usado nesse experimento (Reparixina) é um antagonista alostérico não competitivo e potencialmente inibe uma grande variedade de atividades biológicas induzidas por quimiocinas (Bizzarri et al. 2006, Souza et al. 2004, Gorio et al. 2007, Marsh e Flemming, 2011, Zarbock et al. 2008). Reparixina reduziu a degeneração secundária na medula espinhal de ratos em um modelo de trauma. A droga foi capaz de reduzir a apoptose de oligodendrócitos, a infiltração neutrofílica e de células ED-2 positivas. Além disso, foi observada uma taxa de recuperação superior da movimentação nos membros pélvicos nos animais tratados (Gorio et al. 2007). Da mesma forma,

reparixina inibiu a adesão de neutrófilos ao endotélio de vasos sinoviais, reduzindo o recrutamento de neutrófilos na membrana sinovial e aliviando os danos teciduais em um modelo de artrite em ratos (Coelho et al. 2008). Reparixina também foi capaz de reduzir as lesões provocadas pela isquemia e reperfusão do intestino de ratos por diminuir a permeabilidade vascular e o influxo de neutrófilos (Souza et al. 2004).

Apesar das recentes evidências da participação de leucócitos na origem da laminite (Fontaine et al. 2001, Belknap et al. 2007, Faleiros et al. 2009a, Faleiros et al. 2009b, Faleiros et al. 2011a) e do potencial terapêutico da reparixina sobre a migração de neutrófilos, nenhum estudo com essa droga havia sido conduzido na espécie equina.

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação de um antagonista de CXCR1 e CXCR2 sobre as lesões histológicas iniciais e sobre a expressão de calprotectina no tecido lamelar na laminite equina induzida por oligofrutose.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de ética sobre experimentação animal da UFMG (CETEA/UFMG 225/2009).

Foram utilizados doze equinos sem raça definida (quatro machos e oito fêmeas, idade média de  $7 \pm 3,5$  anos, pesando  $305 \pm 35$  kg, escore corporal  $5 \pm 1$ ), sem histórico prévio de claudicação relacionada aos cascos e previamente adaptados por 2 semanas ao confinamento em baia e a uma dieta exclusiva à base de feno de gramínea (*Cynodum sp*). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (n=6) e tratado (n=6). No tempo considerado zero (T0), todos os animais

receberam 10 g/kg de peso vivo de oligofrutose (Raftilose P95 – Embraparma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda) diluídos em 3 litros de água, via sonda nasogástrica (van Eps e Pollit, 2006). Nos tempos 6, 12, 18 e 24 horas, os animais do grupo tratado receberam, por infusão intravenosa durante 10 minutos, 30 mg/kg (Souza et al. 2004) de peso vivo de reparixina base diluídos em salina estéril 0,9% e filtrados em filtro bacteriológico de 0,22µm (Biofil syringe filter, Jet Biofil, www.jetbiofil.com).

Nos tempos 0, 12, 36 e 72 horas, três biópsias de cada casco foram coletadas: no membro pélvico esquerdo (T0), pélvico direito (T12), torácico direito (T36) e torácico esquerdo (T72). Os animais foram sedados com xilazina 10% (1 mg/kg peso vivo IV) e os cascos foram desensibilizados através anestesia perineural (5 ml de lidocaína 2% em cada ramo no nervo palmar/plantar) ao nível da superfície abaxial dos ossos sesamóides proximais. Para obtenção das biópsias, três perfurações com broca de 8 mm de diâmetro foram feitas na muralha dorsal. Evitou-se o alinhamento entre os furos para não fragilizar transversalmente a muralha. As perfurações com broca terminavam quando se atingia a linha branca e era possível, através de palpação com pinça, perceber um tecido mais macio. Nesse momento, a broca era removida da furadeira e trocada por um sacabocado (punch) de 6 mm de diâmetro interno. O punch era então avançado sob alta rotação até a superfície dorsal da falange distal (Magalhães et al. 2012) (Figuras 1 e 2). As amostras obtidas foram armazenadas em formalina tamponada 10% para estudos histológicos. As perfurações eram tamponadas com gaze até que a hemorragia cessasse e então eram fechadas com polimetilmetacrilato (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, Ltda).



Figura 1- Remoção do extrato córneo com furadeira e broca para obtenção de biópsia do casco



Figura 2- Uso do Punch acoplado a furadeira para remoção do tecido lamelar

As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% e inclusas em parafina. Cortes histológicos com 5µm de espessura foram corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS). A coloração com PAS foi utilizada para observação de anormalidades associadas com a membrana basal (MB) e com os ceratinócitos. Utilizou-se o sistema de graduação histológica proposto por Faleiros et al (2011) em que o método proposto por Pollitt (1996) foi modificado, incluindo 3 novos graus (1-3) para melhor descrição das alterações ocorridas nas

lamelas antes da degradação da membrana basal (Tabela 1).

Com o objetivo de localizar leucócitos nos cortes histológicos, a imunohistoquímica para Calprotectina foi realizada (Faleiros et al. 2009). Cortes histológicos com 5µm de espessura foram aderidos em lamelas de vidro gelatinizadas. Realizou-se a desparafinização em xilol e em seguida a hidratação dos cortes em gradiente decrescente de álcool etílico. A recuperação antigênica foi realizada com proteinase K (20µg/mL) durante 5 minutos. A inativação da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio a 9% durante 15 minutos em dois banhos consecutivos.

Tabela 1. Escores de lesões microscópicas em amostras de tecido lamelar coradas com PAS (Faleiros et al. 2011)

ESCORE PAS	ACHADOS HISTOLÓGICOS
0	Ceratinócitos basais com núcleos elípticos em ângulo reto com a MB. Lamelas epidérmicas secundárias (LES) com o topo arredondado. O ápice das lamelas dérmicas secundárias (LDS) está próximo do eixo ceratinizado (largura de 1 a 2 células basais em distância)
1	Até 50% dos núcleos dos ceratinócitos basais estão arredondados. Nenhuma outra alteração evidente.
2	Maioria dos núcleos dos ceratinócitos basais está arredondada. Nenhuma outra alteração evidente.
3	Maioria dos núcleos dos ceratinócitos basais está arredondada e até 50% dos topos das LES encontram-se alongados com as células basais se destacando da MB.
4 (Grau 1 Pollitt)	Maioria dos núcleos dos ceratinócitos basais está arredondada e a maioria dos topos das LES encontra-se alongada com as células basais se destacando da MB.
5 (Grau 2 Pollitt)	Alongamento das LES e aumento da distância do ápice da LDS ao eixo ceratinizado, caracterizando o descolamento da MB
6 (Grau 3 Pollitt)	A maioria das LES está separada da LDS. Existe quebra da MB e desorganização celular na LES.

Nesse novo sistema, os graus de 1 a 3 originais foram representados pelos graus 4 a 6. Todos os cortes foram analisados por um

investigador alheio aos tempos de coleta e aos grupos de tratamento.

O anticorpo primário (MAC387, abcam) na diluição 1:250 foi incubado a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Utilizou-se anticorpo secundário anti-IgG de camundongo incubado na diluição de 1:100 por 30 minutos. Para a identificação de marcações utilizou-se o sistema ABC incubado por 30 minutos seguido do cromógeno Novared (Vector Laboratories Inc.) por 5 minutos. A análise dos cortes para imunohistoquímica foi feita por um pesquisador alheio aos grupos de tratamento. Um escore de 0 a 5 foi aplicado para cada amostra de acordo com a marcação imunohistoquímica das células epidérmicas: (0) nenhum sinal, (1) manchas de sinais localizados, (2) presença de áreas de sinais difusos em até 25% das lamelas epidérmicas (3) presença de áreas de sinais difusos entre 25 e 50% das lamelas epidérmicas e alguns leucócitos na derme, (4) presença de áreas de sinais difusos entre 50 e 75% das lamelas epidérmicas, (5) presença de áreas de sinais difusos em mais de 75% das lamelas epidérmicas.

Os dados foram submetidos à análise pelo programa Prism 5 for Windows (version 5.00 Trial, March 2007) Usou-se o teste de Mann Whitney para comparação de tratamentos entre tempos e tempos em cada grupo. Para todas as análises utilizou-se um nível de significância de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Após a retirada das amostras houve intensa hemorragia nas perfurações que cessaram com tamponamento com gaze (Figura 3). Os animais toleraram bem o procedimento sem nenhuma intercorrência indesejável.

O método de coleta das biópsias utilizando *punch* acoplado a uma furadeira permitiu a obtenção de amostras adequadas ao estudo da epiderme e junção dermoepidérmica (Figura 4 e 5). Contudo, não foi possível avaliar a presença de leucócitos nas lamelas devido à ausência de derme sublamelar.



Figura 3- Intensa hemorragia após a remoção das amostras de tecido lamelar.

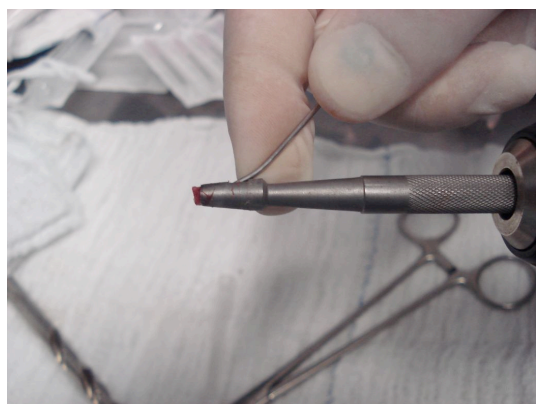


Figura 4- Remoção da amostra de tecido lamelar obtidas através do uso de *punch* acoplado a uma furadeira.

No grupo tratado não houve aumento do escore de PAS em nenhum dos tempos (Figura 6). Os animais nesse grupo tiveram escore entre 1 e 2 (Figura 7). Nos tempos 12 e 36 horas houve um aumento significativo ( $p < 0,048$  e  $p < 0,044$ , respectivamente) do

escore de alterações morfológicas ao exame microscópico do tecido lamelar corado pela técnica de PAS (escore de PAS) no grupo não tratado (Figura 6). A maioria dos animais nesse grupo apresentou escore entre 2 e 3 (Figura 8)



Figura 5- Amostras de tecido lamelar obtidas através do uso de punch acoplado a uma furadeira.

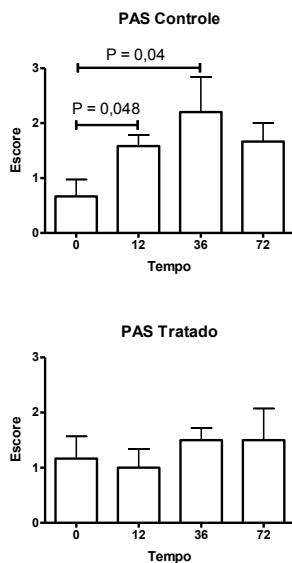


Figura 6 - Escore de alterações histológicas no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) e tratados ou não com reparixina (30mg/kg) ( $p < 0,05$ )

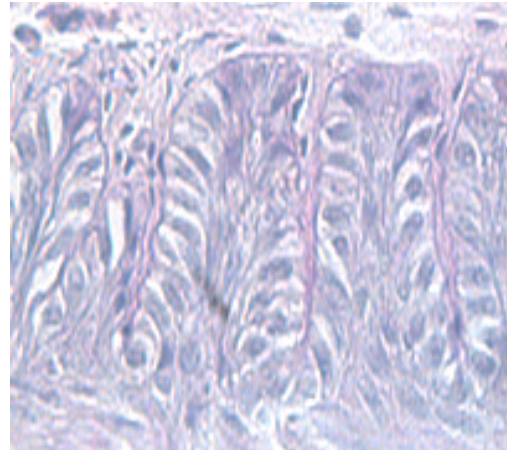


Figura 7 – Fotomicrografia de lamela secundária apresentando escore 1. Até 50% dos núcleos dos ceratinócitos basais estão arredondados. Nenhuma outra alteração evidente.

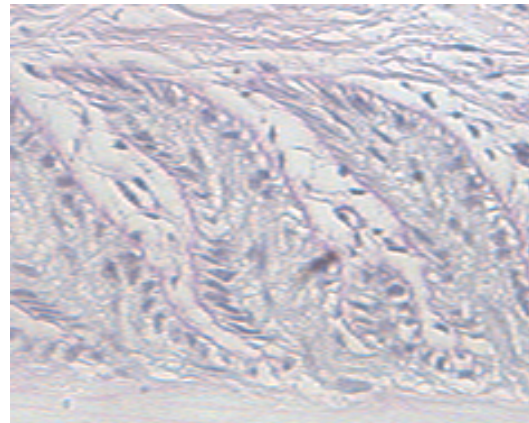


Figura 8 – Fotomicrografia de lamela secundária apresentando escore 3. Maioria dos núcleos dos ceratinócitos basais está arredondada e até 50% dos topos das LES encontram-se alongados com as células basais se destacando da MB.

Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle com relação à marcação de calprotectina na epiderme nos diferentes tempos analisados. Contudo, considerando em conjunto todos os animais, houve uma diferença significativa entre os tempos 0 e 72 horas na marcação das células epidérmicas ( $p < 0,02$ ) (Figura 9).

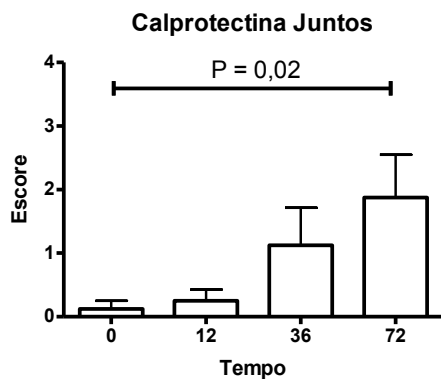


Figura 9- Escore de Calprotectina como marcador de lesão das células epiteliais no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) ( $p < 0,05$ ).

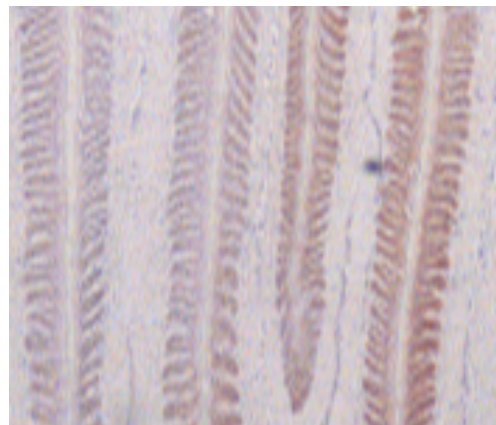


Figura 11- - Fotomicrografia de lamela secundária em equino com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg), apresentando escore 3 de Calprotectina.

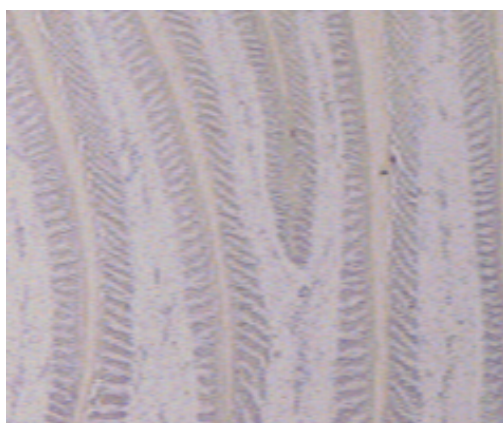


Figura 10- Fotomicrografia de lamela secundária em equino com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg), apresentando escore 0 de Calprotectina.

## DISCUSSÃO

O estudo histológico do tecido lamelar depende da coleta de amostras bem preservadas. Isso tem sido feito, na maioria das vezes, após a eutanásia dos animais. Dessa forma, em experimentos em que se avalia a evolução das lesões ao longo do tempo, é necessária a eutanásia nos tempos estudados, aumentando a necessidade de grupos amostrais maiores. Foi demonstrado recentemente que as lesões histológicas da laminite experimentalmente induzida se desenvolvem homoganeamente em todos os 4 cascos (Leise et al. 2012). Assim, coletas seriadas em um mesmo animal, em cada casco, em diferentes tempos, diminuem a variação individual na laminite experimental e minimizam o uso de animais. Optou-se por iniciar as biópsias nos membros pélvicos uma vez que na fase inicial as lesões lamelares tendem a ser semelhantes nos quatro membros. Com o passar do tempo, os membros torácicos tendem a ser mais acometidos em virtude de sustentarem uma maior proporção do peso (Leise et al 2012). Dessa forma, a chance de encontramos diferenças nos membros anteriores seria maior nos tempos 36 e 72 horas.

A coleta de amostras de tecido lamelar em equinos que são mantidos vivos necessita ser rápida, pouco traumática e adequada ao estudo proposto. Nesse experimento uma nova técnica de coleta foi utilizada (Magalhães et al. 2010). O uso de broca para o desgaste do extrato córneo e do punch sob rotação, utilizando uma furadeira, proporcionou uma forma fácil e rápida de se obter amostras de tecido lamelar. Contudo, o torque exagerado do punch sobre as lamelas limitou a obtenção de amostras providas de derme profunda, limitando sobretudo a observação do infiltrado leucocitário.

O aumento do escore de calprotectina nas células epidérmicas no tempo 72 horas e as alterações histológicas encontradas no grupo controle evidenciam a eficácia do modelo de laminite usado nesse estudo, ou seja, os animais desenvolveram laminite. Contudo, foram observados, de forma consistente, baixos escores de PAS e de Calprotectina, sugerindo níveis de danos lamelares e inflamação relativamente baixos em comparação com outros estudos utilizando variados modelos de indução de laminite. Em um estudo em que a mesma dosagem de oligofrutose foi utilizada em 8 animais, a média de escore de PAS foi de 2 (correspondente ao escore 5 em nosso estudo) no tempo de 48 horas (van Eps e Pollitt, 2006). Embora o tecido lamelar não tenha sido avaliado exatamente no tempo 48 horas, a média de escore de PAS encontrada neste experimento nos tempos 36 e 72 horas no grupo controle foi aproximadamente 2, ou seja, a média de score foi inferior a metade do outro estudo. Em outro experimento utilizando o modelo de sobrecarga com carboidratos, metade dos animais desenvolveu escores de PAS entre 3 e 4 entre 20 e 48 horas, novamente escores acima do encontrado neste estudo (Faleiros et al. 2011). Contudo os animais não apresentaram

alterações significativas no tecido lamelar na fase de desenvolvimento entre 10 e 20 horas, o que foi observado a partir de 12 horas neste experimento. Possivelmente, a oferta de oligofrutose disponibilize mais facilmente os carboidratos livres favorecendo as alterações do microambiente intestinal mais precocemente. Isso levaria a uma absorção mais precoce de Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs) e Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs). DAMPs e PAMPs originadas no intestino lesado supostamente desencadeiam as alterações originárias da degradação lamelar (Milinovich et al. 2006; Belknap 2010; Milinovich et al. 2010)

A grande variabilidade amostral e as limitações impostas pelo tamanho das biópsias possivelmente não permitiram a observação de diferenças significativas nos grupos tratados e controle em relação ao escore de calprotectina. No entanto, com o aumento do tamanho amostral (n), quando todos os animais foram agrupados, foi possível observar o aumento do escore de calprotectina na epiderme lamelar no tempo 72 horas. Isso demonstra que houve stress ou danos às células epiteliais nesse período, contrastando com os resultados de outro estudo em que essa alteração foi observada mais precocemente; ou seja, entre 20 e 48 horas (Faleiros et al. 2011). Dessa forma, além do baixo grau de lesão identificado pelos pequenos escores de PAS, o estresse das células epiteliais pareceu ser mais tardio em nosso estudo.

O menor grau de inflamação encontrado nesse experimento pode ser atribuído ao baixo peso da maioria dos animais. A quantidade limitada da droga testada disponível para a realização dessa pesquisa foi o principal motivo para a utilização de animais mais leves. Dessa forma, é provável

que o grau de lesão microscópica seja influenciado de alguma maneira pelo peso do paciente. Por outro lado, a origem heterogênea dos animais, sendo a maioria oriunda de serviços de apreensão e, portanto, habituados a condições precárias de subsistência, pode ter contribuído para uma possível resistência ao desenvolvimento da laminite. Citocinas antiinflamatórias ou enzimas protetoras da ação oxidativa de radicais livres poderiam estar super expressas no tecido desses animais. Além disso, a hemorragia provocada pelos procedimentos de biópsia pode ter contribuído para a perda das moléculas deflagradoras da inflamação lamelar. Vale ressaltar que há cerca de 2000 anos, e mesmo hoje em dia em algumas práticas empíricas, a sangria continua sendo usada como tratamento da laminite (Heymering, 2010). Contudo, essas hipóteses precisam ser confirmadas por estudos adicionais.

Pela primeira vez, um antagonista dos receptores de CXCR1 e CXCR2, foi estudado em equinos. A ausência de aumento no escore de PAS no grupo tratado sugere que o fármaco foi capaz de atenuar os danos ao tecido lamelar em equinos com laminite induzida pelo modelo de oligofrutose. Adicionalmente, em um estudo paralelo de biologia molecular (capítulo 4) foi observada a supressão da expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 nas mesmas amostras no tempo (T12) no grupo tratado. Isso sugere fortemente a ação de reparixina em atenuar lesões lamelares mediadas pela ação dessas citocinas. Enfatiza-se ainda que alguns animais no grupo controle adquiriram o escore 3, significando perda de adesão das células epidérmicas à membrana basal. No grupo tratado nenhum animal ultrapassou o escore 2. Dessa forma, esses achados sugerem que a reparixina preveniu o colapso

da junção dermo-epidérmica, a lesão chave da falência lamelar.

Os efeitos da reparixina observados neste estudo puderam ser percebidos com os animais tratados por 24 horas (30 mg/kg a cada 6 horas). Apesar das lesões articulares terem sido minimizadas pela aplicação de reparixina 40 minutos antes, 3 e 6 horas depois da indução de artrite em ratos (Coelho et al. 2008) ou imediatamente antes da reperfusão do intestino em ratos (Souza et al. 2004), os melhores resultados terapêuticos no trauma da medula espinhal em ratos requereram tratamento por 7 dias (Gorio et al. 2007). Assim, é provável que um tratamento mais prolongado poderia apresentar melhores resultados na laminite equina. Da mesma forma, os melhores resultados foram obtidos quando os níveis plasmáticos foram mantidos em 8  $\mu$ l/ml em um modelo murino de trauma espinhal (Gorio et al. 2007). Contudo a farmacocinética da reparixina não foi determinada neste experimento. Isso abre uma vasta perspectiva de novos estudos para que diferentes regimes de doses e períodos de tratamento sejam investigados na espécie equina.

## CONCLUSÃO

O modelo de oligofrutose induziu laminite branda nos cavalos estudados e aumentou a expressão de calprotectina na epiderme. Contudo, a técnica de biópsia utilizada inviabilizou o estudo da derme sublamelar e o infiltrado leucocitário. A reparixina atenuou as lesões no tecido lamelar. Estudos adicionais com reparixina na laminite equina devem ser encorajados.

## REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, D.M.; WAGNER, B.; FRANCHINI, M. et al., Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.*, v. 67, n. 4, p. 669-677, 2006.
- BELKNAP, J.K. Black walnut extract: an inflammatory model. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, v. 26, n.1, p. 95-101, 2010.
- BELKNAP, J.K.; GIGUÈRE, S.; PETTIGREW, A. et al. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. *Equine Vet J.*, v. 39, n. 1, p. 42-7, 2007.
- BLACK, S.J.; LUNN, D.P.; YIN, C. et al. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n.109 (1-2), p. 161-166, 2006.
- COELHO, F.M.; PINHO, V.; AMARAL, F.A. et al. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum.* v.58, n.8, p.2329-2337, 2008.
- CUNHA, T.M.; VERRIWA, J.R.; VALÉRIO, D.A., et al.. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *Eur J Pain.* v.12, n.8, p.:1059-68, 2008.
- FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.J. et al. Laminar Leukocyte Accumulation in Horses with Carbohydrate Overload-Induced Laminitis. *J Vet Intern Med.*, v. 25, p. 107–115, 2011.
- 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. *J Vet Intern Med.*, v. 23, n.1, p. 174-181, 2009.
- FRENCH, K.R.; POLLITT, C.C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model. *Equine vet. J.*, v. 36, p. 230-235, 2004.
- GORIO, A.; MADASCHI, L.; ZADRA, G. et al. Reparixin, an inhibitor of CXCR2 function, attenuates inflammatory responses and promotes recovery of function after traumatic lesion to the spinal cord. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.*, v. 322, n. 3, p. 972-981, 2007.
- HEYMERING H.W. A historical perspective of laminitis. *Vet Clin North Am Equine Pract.* v. 26, n.1, p. 1-11, 2010.
- HURLEY, D.J.; PARKS, R.J.; REBER, A.J. et al. Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 110(3-4), p. 195-206, 2006.
- KATZ L.M.; BAILEY S.R. A review of recent advances and current hypotheses on the pathogenesis of acute laminitis. *Equine Vet J.* v. 44, n.6, p.752-761, 2012.
- LEISE BS, FALEIROS RR, WATTS M, et al. Hindlimb laminar inflammatory response is similar to that present in

forelimbs after carbohydrate overload in horses. *Equine Vet J.* v.44, n.6, p. 633-639, 2012.

LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; PETTIGREW, A. et al. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut- induced laminitis. *Am J Vet Res.*, v. 68, n. 11, p. 1205-1211, 2007.

MAGALHÃES, J.F.; LIMA, I. R.; MARKOWICZ, LC, et al. Método simples de biópsia para avaliação do tecido lamelar no casco de equinos. In: XIX SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2010, Belo Horizonte. Anais.... Belo Horizonte: UFMG, 2010. v. On Lin.

MILINOVICH, G.J.; KLIEVE, A.V.; POLLITT, C.C. et al. Microbial Events in the Hindgut During Carbohydrate-induced Equine Laminitis. *Vet Clin Equine.*, v. 26, p. 79-94, 2010.

MILINOVICH, G.J.; TROTT, D.J.; BURRELL, P.C. et al. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environmental Microbiology.*, v. 8 n. 5, p. 885-898, 2006.

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

POLLITT, C.C. Conferência Anual da ABRAVEQ, 8, 2007, São Paulo. The horse's foot – the inside story. São Paulo, ABRAVEQ, 2007, 29 p. Disponível em: [www.abraveq.com.br](http://www.abraveq.com.br). Acesso em: 04/12/2012.

POLLITT, C.C. Conferência Anual da ABRAVEQ, 8, 2007, São Paulo. Laminitis Theory. Shots around the target. São Paulo, ABRAVEQ, 2007, 15 p. Disponível em:

[www.abraveq.com.br](http://www.abraveq.com.br). Acesso em: 04/12/2012.

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

SOUZA D.G.; BERTINI R.; VIEIRA A.T. et al. Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br J pharmacol.* v.143, n.1, p.132-142, 2004.

STEWART A.J.; PETTIGREW A.; COCHRAN, A.M. et al. Indices of inflammation in the lung and liver in the early stages of the black walnut extract model of equine laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.* v.129, n. 3-4, p. 254-260, 2009.

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

VISSER, M.B.; POLLITT, C.C. Lamellar leukocyte infiltration and involvement of IL-6 during oligofructose-induced equine laminitis development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2011), doi:10.1016/j.vetimm.2011.07.016

WOODMAN, L.; SUTCLIFFE, A.; KAUR D. et al., Chemokine concentrations and mast cell chemotactic activity in BAL fluid in patients with eosinophilic bronchitis and asthma, and in normal control subjects. *Chest.*, v. 130, n. 2, p. 371-378, 2006.

ZARBOCK, A.; ALLEGRETTI, M.; LEY, K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by

Reparixin attenuates acute lung injury in mice. *Br J Pharmacol.*, v. 155, n. 3, p. 357-364, 2008.

## CAPÍTULO 4

### **Efeitos de um agente antagonista de receptores CXCR1 e CXCR2 sobre a expressão de IL-1-beta, IL-6 e CXCL1 nas lamelas do casco de equinos submetidos ao modelo de laminite induzida por oligofrutose**

Leonardo R. de Lima<sup>2</sup>, Heloisa M.F. Mendes<sup>2</sup>, Jessica F. Magalhães<sup>2</sup>, Ludmila Markowitz, Carolina B. Cavalcanti<sup>2</sup>, Frederico Soriani, Fabíola O. Paes Leme<sup>2</sup>, Mauro M Teixeira, Rafael R.Faleiros<sup>2</sup>.

#### RESUMO

O evento inicial que deflagra a falência estrutural da junção dermoepidérmica na laminite equina ainda é pouco compreendido. O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8) no estágio de desenvolvimento da laminite, indica que a presença de quimiocinas atrativas de leucócitos pode desempenhar importante papel na migração leucocitária nos eventos iniciais da laminite. O bloqueio seletivo dos receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2 como alvo terapêutico ainda não foi avaliado na laminite equina. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação de um antagonista de CXCR1 e CXCR2 sobre a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e da quimiocina CXCL1 no tecido lamelar de equinos submetidos ao modelo de indução de laminite por oligofrutose. Doze equinos receberam oligofrutose (10 g/kg de peso vivo PO) no tempo 0 e foram divididos em 2 grupos: tratados (30 mg/kg p.v. de reparixina IV, nos tempos 6, 12, 18 e 24 h) e controle. Três biopsias foram colhidas nos tempos 0, 12, 36 e 72h nos cascos pélvico esquerdo, pélvico direito, torácico direito e torácico esquerdo, respectivamente. Análise de PCR em tempo real foi utilizada para se determinar a expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL1 nas amostras. Reparixina suprimiu a resposta de IL-1 $\beta$  e IL-6 no tempo 12, mas não afetou a resposta de CXCL1, sugerindo uma atenuação da resposta inflamatória lamelar.

Palavras chave: cavalos, laminite, neutrófilos, quimiocinas, reparixina.

#### ABSTRACT

*The initial event that causes the dermal-epidermal junction separation in equine laminitis is not still understood. Over expression of pro inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, and IL-8) in the developmental phases indicates that leukocytes attractive chemokines could be involved in the initial laminitis. Selective blockage of CXCR1 and CXCR2 receptors of chemokines ELR+ as therapeutic target has not been evaluated in equine laminitis. The objective of this research was to determine the effect of reparixin, an inhibitor of CXCR1 and CXCR2 over the expression of IL- $\beta$ ,*

*IL-6 and the chemokine CXCL1 on lamellar tissue of horses with laminitis induced by oligofructose. Twelve horses were given oligofructose (10g/kg bw PO) at time 0 and divided in two groups: treated (30 mg/kg bw.reparaxin IV, times 6, 12, 18 e 24 h) and no treated. Three biopsy samples were taken at 0,12,36,72 hours on hooves left hind, right hind, right front and left front respectively. Samples were subjected to RT-PCR to determine the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL. Reparaxin attenuated the IL-1 $\beta$  e IL-6 response at 12 hours, but not interfered in CXCL1 response. Our findings suggest that reparaxin ameliorated the lamellar inflammatory response in horses with oligofructose-induced laminitis.*

*Keywords: horse, laminitis, neutrophils, chemokine, reparaxin.*

## INTRODUÇÃO

O evento inicial que deflagra a falência estrutural da junção dermo-epidérmica na laminite equina ainda é pouco compreendido (Katz e Baley 2012). Existem várias similaridades entre o paciente equino séptico predisposto a desenvolver laminite e seres humanos sépticos predispostos ao desenvolvimento de falência múltipla de órgãos (MODS) (Belknap et al. 2009, Stewart et al. 2009). Sinais clínicos comuns às duas espécies apresentando SIRS (Síndrome da resposta inflamatória sistêmica) são febre, leucopenia, membranas mucosas hipercoradas e taquicardia (Maier, 2000). Outras semelhanças entre equinos e humanos apresentando SIRS são a migração de leucócitos a partir da corrente sanguínea e a ativação de leucócitos residentes em vários tecidos (Black et al. 2006, Hurley et al. 2006; Belknap et al. 2007; Loftus et al. 2007, Stewart et al. 2009, Faleiros et al. 2011a). Além disso, o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8) indica que quimiocinas podem desempenhar importante papel nos eventos iniciais da laminite (Belknap et al. 2007, Faleiros et al. 2009, Faleiros et al. 2011). Quimiocinas pró-inflamatórias têm sido detectadas em vários tecidos humanos e equinos afetados por condições inflamatórias associadas com grave

infiltração neutrofílica (Franchini et al. 2000, Giustizieri et al. 2001, Ainsworth et al. 2006, Woodman et al. 2006). Receptores CXCR1 e CXCR2 acoplados a proteína G (GPCRs), são os únicos receptores para as quimiocinas CXCL ERL positivas (portadoras do peptídeo glutamina-leucina-arginina). CXCR1 se liga a CXCL1, CXCL6, CXCL8 e CXCR2 se liga a CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8. Esses receptores são o maior grupo expresso nos neutrófilos e são os receptores protótipo das quimiocinas inflamatórias, agindo na inflamação aguda e na imunidade inata (Guerreiro et al. 2011). Além dos neutrófilos e monócitos, expressam-se em linfócitos T, células dendríticas, eosinófilos, basófilos e mastócitos (Mukaida, 2003, Guerreiro et al. 2011, Kim et al. 2011). O bloqueio farmacológico seletivo de CXCR1 e CXCR2 representa um promissor horizonte no controle das lesões de origem inflamatória com potencial para o tratamento e prevenção da laminite equina (Bizzarri, et al. 2006, Coelho et al. 2008).

Reparaxina potencialmente inibe uma grande variedade de atividades biológicas induzidas por quimiocinas (Souza et al. 2004, Bertini et al. 2004, Bizzarri et al. 2006, Gorio et al. 2007, Moriconi et al. 2007, Zarbock et al. 2008, Marsh e Flemming, 2011). A droga tem se demonstrado um potente antagonista

da migração de neutrófilos tanto “in vitro” como “in vivo” (Bertini et al. 2004). Assim, várias pesquisas têm sido realizadas sobre seus efeitos em lesões onde o envolvimento de neutrófilos é bem caracterizado. Em modelos de injúria de isquemia e reperfusão (I/R) no fígado de ratos, reparixina demonstrou diminuir a infiltração neutrofílica e a necrose hepática (Cavalieri et al. 2005, Clarke et al. 2011). Em modelos de isquemia e reperfusão cerebral, reparixina diminui a infiltração neutrofílica demonstrada histologicamente e pela atividade de mieloperoxidase. Além disso, a droga melhorou a recuperação dos déficits neurológicos nos ratos tratados (Garau et al. 2006, Villa et al. 2007). O pré tratamento de ratos receptores com reparixina, foi capaz de prevenir a infiltração de granulócitos e melhorar a função de rins transplantados (Cugini et al. 2005). Por outro lado, reparixina aplicada por via intravenosa em voluntários humanos, não foi capaz de reduzir a resposta inflamatória sistêmica medida pela expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Leitner et al. 2007).

Apesar das recentes evidências da participação de leucócitos na origem da laminite (Fontaine et al. 2001, Belknap et al. 2007, Faleiros et al. 2009a, Faleiros et al. 2009b, Faleiros et al. 2011a) e do potencial terapêutico da reparixina, nenhum estudo com essa droga havia sido conduzido na espécie equina.

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação da reparixina sobre a expressão de RNA das citocinas inflamatórias IL-1 beta, IL-6 e da quimiocina CXCL1 no tecido lamelar de equinos com laminite induzida por oligofrutose.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de ética sobre experimentação animal da UFMG (CETEA/UFMG 225/2009).

Foram utilizados doze equinos sem raça definida (quatro machos e oito fêmeas, idade

média de  $7 \pm 3,5$  anos, pesando  $305 \pm 35$ kg, escore corporal  $5 \pm 1$ ), sem histórico prévio de claudicação relacionada aos cascos e previamente adaptados por 2 semanas ao confinamento em baia e a uma dieta exclusiva à base de feno de gramínea (*Cynodum sp*). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, controle (n=6) e tratado (n=6). No tempo considerado zero (T0), todos os animais receberam 10g/kg de peso vivo de oligofrutose (Raftilose P95 – Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda) diluídos em 3 litros de água, via sonda naso-gástrica (van Eps e Pollit, 2006). Nos tempos 6, 12, 18 e 24 horas, os animais do grupo tratado receberam, por infusão intravenosa durante 10 minutos, 30 mg/kg (Souza et al. 2004) de peso vivo de reparixina base diluídos em salina estéril 0,9% e filtrados em filtro bacteriológico de 0,22 $\mu$ m (Biofil syringe filter, Jet Biofil, www.jetbiofil.com).

Nos tempos 0, 12, 36 e 72 horas, 3 biópsias de cada casco foram coletadas sequencialmente no membro pélvico esquerdo (T0), pélvico direito (T12), torácico direito (T36) e torácico esquerdo (T72). Os animais foram sedados com Xilazina 10% (1 mg/kg peso vivo IV) e os cascos foram desensibilizados através anestesia perineural (5 ml de lidocaína 2% em cada ramo do nervo palmar/plantar) ao nível da superfície abaxial dos ossos sesamóides proximais. Para obtenção das biópsias, três perfurações com broca de 8 mm de diâmetro foram feitas na muralha dorsal. Evitou-se o alinhamento dos furos para não fragilizar transversalmente a muralha. As perfurações com broca terminavam quando se atingia a linha branca e era possível através de palpação com pinça, perceber um tecido mais macio. Nesse momento, a broca era removida da furadeira e trocada por um sacabocado (punch) de 6 mm de diâmetro interno. O punch era então avançado sob alta rotação até a superfície dorsal da falange distal. As amostras obtidas foram depositadas em microtubos livres de RNA e colocadas em

nitrogênio líquido até serem armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

Todos os procedimentos relacionados ao PCR em tempo real como extração de mRNA, ressuspensão do *pellet* de mRNA, obtenção do cDNA e PCR em tempo real foram realizados seguindo-se os protocolos empregados no Laboratório Interação Microorganismo-Hospedeiro (LIMHO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, conforme detalhados a seguir.

#### *Extração de RNA*

Os fragmentos de biópsia foram descongelados, colocados em placa de Petri para a separação do extrato córneo e da derme remanescente com auxílio de lamela de bisturi. Deste modo, o fragmento utilizado para a extração continha apenas tecido lamelar, ou seja, lamelas dérmicas e epidérmicas.

A extração foi feita adicionando-se primeiramente 500  $\mu\text{l}$  de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) em microtubo de fundo cônico de volume de 2 ml contendo a amostra, seguindo-se homogeneização. Logo após, adicionou-se mais 500  $\mu\text{l}$  de Trizol, totalizando 1 ml/100mg de tecido. Adicionou-se 200  $\mu\text{l}$  de clorofórmio e realizou-se a homogeneização em vórtex. Em seguida, centrifugou-se as amostras durante 10 minutos a 12000 rpm em centrífuga refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ . O homogeneizador foi higienizado em três etapas utilizando-se tubos Falcon de 50 ml com água destilada, álcool a 70% e água destilada no intervalo entre uma amostra e outra.

Após a centrifugação pipetou-se a fase aquosa (RNA) em novo microtubo contendo 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol. Seguiu-se nova centrifugação a 12000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, para obtenção do *pellet* de RNA. O isopropanol foi desprezado lentamente e adicionou-se 150  $\mu\text{l}$  de etanol a 70% com DEPC (Dietilpirocarbonato). Centrifugou-se novamente a 12000rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. O etanol a 70% foi pipetado

lentamente, procurando-se não perturbar o *pellet* de RNA. Os microtubos foram mantidos abertos sobre folha de papel para a secagem do *pellet*.

#### *Ressuspensão do pellet de RNA*

Adicionou-se de 20  $\mu\text{l}$  a 40  $\mu\text{l}$  de água com DEPC aos eppendorfs com *pellet* de RNA. As amostras foram aquecidas em banho-maria a  $60^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. A quantidade de RNA recuperado foi obtida após leitura no espectrofotômetro com resultados em ng/ $\mu\text{l}$ .

#### *Obtenção do cDNA*

Para a obtenção do cDNA adicionou-se 1  $\mu\text{l}$  de oligodT (50mM) ao volume de RNA utilizado e seguiu-se aquecimento a  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e resfriamento abrupto em gelo. Para a preparação do cDNA utilizou-se 1  $\mu\text{l}$  de dNTP (10mM), 1  $\mu\text{l}$  de DTT (1M), 4  $\mu\text{l}$  de Tampão SuperScript (5X), 1  $\mu\text{l}$  RNase Out e 1  $\mu\text{l}$  de SuperScript III (SuperScript® III Reverse Transcriptase-Invitrogen Cat no. 18080-044), submetidos a termociclador (MJ Research) durante 90 minutos seguidos de 15 minutos a  $75^{\circ}\text{C}$ .

#### *Primers*

A sequência dos primers utilizados foram as descritas na Tabela 1. A escala de síntese foi de 25nmol, dessalinizado. Após sua confecção, os primers foram diluídos e utilizados na concentração de 5  $\mu\text{M}$ .

Tabela 1 – Sequências de primers utilizados para PCR em tempo real

Gene	Direção	Sequência
$\beta$ -actina	Forward	5'- TTCCCTGGAGAAGAGCTACG A-3'
$\beta$ -actina	Reverse	5'- TTTCGTGGATGCCACAGGAT- 3'
IL-1 $\beta$	Forward	5'- GCTGCCTTCCCTATATTAGTG C-3'
IL-1 $\beta$	Reverse	5'- AGTGAGTAGCAGAGGTGAGA G-3'
IL-6	Forward	5'-

			TCTTCACAAGCACCGTCACT-3'
IL-6	Reverse	5'-	GTGGGGAAAGCAGTAGCCAT-3'
CXCL-1	Forward	5'-	TCTCAATCCTGAAGCCCCA-3'
CXCL-1	Reverse	5'-	GCCAAACAGCAACCAGTACAC-3'

### PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se 5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de primer forward, 1 µl de primer reverse e 1 µl de água ultrapura para cada amostra, em duplicata, no aparelho Real Time PCR Fast 7500 (Applied Biosystems). Utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para a análise de resultados.

### Análise estatística dos dados

Utilizou-se One-Way ANOVA e o pós-teste Teste de Newman-Keuls, software GraphPad Prism 5.0, considerando-se  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

No tempo 12 horas houve um aumento de 20 vezes na expressão de IL-1 $\beta$  no grupo controle em comparação com o grupo tratado ( $P < 0,0016$ ). Não houve diferença nos níveis de IL-1 $\beta$  nos tempos 36 e 72h em relação ao tempo 0 (Figura 1).

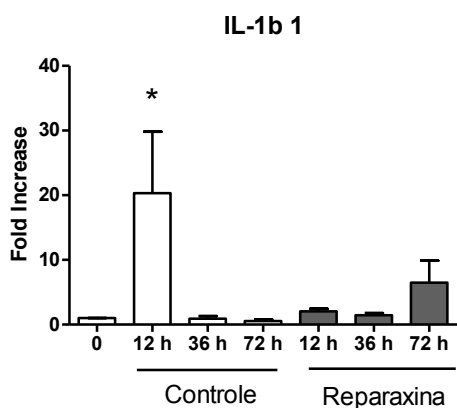


Figura 1 – Expressão de IL-1 $\beta$  no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) e tratados ou não com reparixina (30mg/kg) ( $p < 0,05$ ).

Não houve diferenças significativas na expressão de CXCL1 entre grupos e ao longo do tempo.

Novamente, no tempo 12 horas houve um aumento de 8 vezes na expressão de IL-6 no grupo não tratado em comparação com o grupo tratado ( $P < 0,03$ ). Não houve diferença nos níveis de IL-6 nos tempos 36 e 72h em relação ao tempo 0 em nenhum dos grupos (Figura 2).

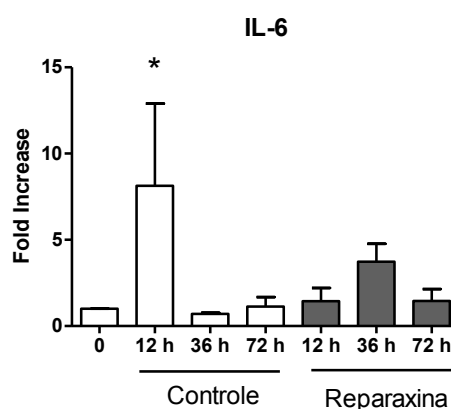


Figura 2- Expressão de IL-6 no tecido lamelar em equinos com laminite induzida por oligofrutose (10g/kg) e tratados (T) ou não (NT) com reparixina (30mg/kg) ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

A técnica de coleta de biópsias do casco utilizada nesse estudo ainda não havia sido testada. O uso de broca para o desgaste do extrato córneo e do punch sob rotação, utilizando uma furadeira, proporcionou uma forma fácil e rápida de se obter amostras de tecido lamelar. A ausência de alterações significativa da  $\beta$  – actina utilizada como gene normalizador demonstrou que não houve degradação do tecido. Assim, o uso dessa técnica de biópsia foi adequado para os estudos de biologia molecular.

A participação de neutrófilos e outros leucócitos na fisiopatologia da laminite

equina têm recebido bastante atenção da comunidade científica nos últimos anos. Muitos mediadores inflamatórios e citocinas, incluindo interleucinas e quimiocinas, parecem estar envolvidos nos estágios prodrômicos da doença (Visser e Pollitt, 2011, de la Rebière de Pouyade e Serteyn, 2011).

O aumento da expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 no tempo 12h nos animais não tratados sugere que alterações inflamatórias foram produzidas pelo modelo de indução de laminite por oligofrutose em cavalos brasileiros sem raça definida.

IL-1 $\beta$  é expressa por grande variedade de células, incluindo ceratinócitos, células endoteliais e do sistema imune (Ren e Torres, 2009). IL-1 $\beta$  é capaz de aumentar a expressão de MAIL (molecule possessing ankyrin-repeats induced by lipopolysaccharide) que por sua vez leva a produção de IL-6 (Waguespack et al. 2004b, de la Rebière de Pouyade e Serteyn, 2011). O aumento dessas citocinas foi encontrado no período de desenvolvimento da laminite (Fontaine et al. 2001, Waguespack et al. 2004a, Belknap et al. 2007, Loftus et al. 2007, Belknap 2010).

Em um trabalho feito por Belknap et al. (2007), IL-1  $\beta$  não aumentou no início da claudicação (24 a 30 horas) na laminite induzida por oligofrutose, como ocorreu em nossa pesquisa nos tempos 36 e 72 horas. Infelizmente o tempo de 12 horas não foi avaliado, dificultando comparações. Já IL-6 apresentou um aumento expressivo (201 vezes) entre 24 e 30 horas em contraste com o observado em nosso estudo em que não houve aumento de IL-6 nos tempos 36 e 72 horas. É possível que a baixa magnitude da resposta inflamatória dos animais em nosso experimento seja responsável pela não elevação da expressão de IL-6 no tempo 36 e 72 horas.

Em um estudo utilizando o modelo de indução de laminite por Black Walnut (Faleiros et al. 2009a) houve aumento da

expressão de CXCL1 1,5 hora e entre 3 e 4 horas (161 e 20 vezes respectivamente). Contudo, no tempo 12 horas os níveis de CXCL1 era igual ao basal. A expressão de CXCL1 não apresentou aumento no presente estudo. Embora o modelo de indução tenha sido diferente, é possível que o aumento da expressão de CXCL1 se deu antes do período analisado. A expressão precoce de CXCL1 pode preceder a elevação de IL-1 $\beta$  e IL-6, uma vez que CXCL1 é uma das primeiras quimiocinas a surgirem na resposta inflamatória (Faleiros et al. 2009a). Produzida por ceratinócitos e células endoteliais, CXCL1 poderia atrair os leucócitos responsáveis pela resposta de IL-1  $\beta$  e IL-6 observada nesse experimento. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Pela primeira vez, um antagonista dos receptores de CXCR1 e CXCR2, foi estudado em equinos. Dados farmacocinéticos da reparixina são completamente ausentes para a espécie equina até o momento, de forma que a dosagem empregada nesse estudo foi extrapolada de outro experimento feito com ratos (Souza et al. 2004). Uma vez que importantes diferenças foram encontradas entre a meia vida da droga em ratos (0,5 horas) e cães (10 horas) (Midgley et al. 2006), estudos sobre a farmacocinética em cavalos precisam ser realizados.

A supressão da expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 sugere fortemente a ação do antagonista de CXCR1 e CXCR2 em nosso estudo. De fato, a produção de IL-1 $\beta$  foi reduzida pela adição de reparixina a neutrófilos humanos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) e CXCL8 'in vitro'. Além disso, reparixina foi capaz de bloquear a liberação de MMP-9 dos neutrófilos induzida por CXCL8 (Casilli et al 2005). Chama a atenção o fato de MMP-9 ser uma das enzimas elevadas no tecido lamelar de cavalos com laminite e tem sido indicada como potencial degradante da membrana basal e junção dermo-epidérmica (Pollitt 1996, Pollitt e Daradka, 1998, French e Pollitt, 2004,

Loftus et al. 2006, Pollitt 2007a, 2007b, Loftus et al. 2009)

## CONCLUSÃO

A atenuação da expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 indica um efeito antiinflamatório da reparixina na laminite equina. Estudos adicionais são necessários para verificar uma possível proteção do tecido lamelar pela reparixina. Além disso, a expressão de outras citocinas e quimiocinas na laminite equina merece ser estudada sob o efeito da reparixina.

## REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, D.M.; WAGNER, B.; FRANCHINI, M. et al. Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.*, v. 67, n. 4, p. 669-677, 2006.
- BELKNAP, J.K. Black walnut extract: an inflammatory model. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, v. 26, n.1, p. 95-101, 2010.
- BELKNAP, J.K.; GIGUÈRE, S.; PETTIGREW, A. et al. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. *Equine Vet J.*, v. 39, n. 1, p. 42-7, 2007.
- BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N.; CROUSER, E.C. Sepsis-From human organ failure to laminar failure. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.129, p. 155-157, 2009.
- BERTINI, R.; ALLEGRETTI, M.; BIZZARRI, C., et al. Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: Prevention of reperfusion injury. *PNAS*, v. 101,n. 32, p. 11791-11796, 2004.
- BLACK, S.J.; LUNN, D.P.; YIN, C. et al. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n.109 (1-2), p. 161-166, 2006.
- BIZZARRI, C.; BECCARI, A.R.; BERTINI, R. et al. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharm Ther.*, v. 112, p. 139-149, 2006.
- CASILLI, F.; BIANCHINI, A.; GLOAGUEN, I. et al. Inhibition of interleukin-8 (CXCL8/IL-8) responses by repertaxin, a new inhibitor of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Biochemical Pharmacology*, v. 69, n. 3, p. 385-394, 2005.
- CAVALIERI, B.; MOSCA, M.; RAMADORI, P. et al. Neutrophil recruitment in the reperfused-injured rat liver was effectively attenuated by repertaxin, a novel allosteric noncompetitive inhibitor of CXCL8 receptors: a therapeutic approach for the treatment of post-ischemic hepatic syndromes. *Int J Immunopathol Pharmacol.* v.18, p.475-486, 2005.
- CLARKE, C.; KUBOKI,S.; SAKAI, N., et al. CXC Chemokine Receptor-1 is Expressed by Hepatocytes and Regulates Liver Recovery After Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Hepatology*, v. 53, n. 1, p. 261-271, 2011
- COELHO, F.M.; PINHO, V.; AMARAL, F.A. et al. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum.* v.58, n.8, p.2329-2337, 2008.
- CUGINI, D.; AZZOLLINI, N.; GAGLIARDINI, E., et al. Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney International*, v. 67, p. 1753-1761, 2005.

- DE LA REBIÈRE DE POUYADE G, SERTEYN D. The role of activated neutrophils in the early stage of equine laminitis. *Vet J.* v.189, n.1, p. 27-33, 2011.
- FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.J. et al. Lamina Leukocyte Accumulation in Horses with Carbohydrate Overload-Induced Laminitis. *J Vet Intern Med.*, v. 25, p. 107–115, 2011.
- FALEIROS, R.R.; LEISE, B.S.; WATTS, M. et al. Lamina chemokine mRNA concentrations in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 144(1-2), p. 45-51, 2011.
- FALEIROS, R.R.; LEISE, B.B.; WESTERMAN, T. et al. In vivo and in vitro evidence of the involvement of CXCL1, a keratinocyte-derived chemokine, in equine laminitis. *J Vet Intern Med.*, v. 23, n. 5, p. 1086-96, 2009a.
- 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. *J Vet Intern Med.*, v. 23, n.1, p. 174-181, 2009b.
- FONTAINE, G.L.; BELKNAP, J.K.; ALLEN, D. et al. Expression of interleukin-1beta in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. *Am J Vet Res.*, v. 62, n. 5, p. 714-720, 2001.
- FRANCHINI, M.; GILL, U.; VON FELLEBERG, R. et al. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res.*, v. 61, n. 11, p. 1369-1374, 2000.
- FRENCH, K.R.; POLLITT, C.C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model. *Equine vet. J.*, v. 36, p. 230-235, 2004.
- GARAU, A.; BERTINI, R.; MOSCA, M., et al. Development of a systemically-active dual CXCR1/CXCR2 allosteric inhibitor and its efficacy in a model of transient cerebral ischemia in the rat. *Eur. Cytokine Netw.*, v. 17, n 1, p.35-41, 2006.
- GIUSTIZIERI, M.L.; MASCIA, F.; FREZZOLINI, A. et al. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 107, p. 871–877, 2001.
- GORIO, A.; MADASCHI, L.; ZADRA, G. et al. Reparixin, an inhibitor of CXCR2 function, attenuates inflammatory responses and promotes recovery of function after traumatic lesion to the spinal cord. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.*, v. 322, n. 3, p. 972-981, 2007.
- GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J.M. As quimiocinas e os seus receptores. *Acta Med Port.* v.24, n.S4, p. 967-976, 2011
- HURLEY, D.J.; PARKS, R.J.; REBER, A.J. et al. Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 110(3-4), p. 195-206, 2006.
- KATZ L.M.; BAILEY S.R. A review of recent advances and current hypotheses on the pathogenesis of acute laminitis. *Equine Vet J.* v. 44, n.6, p.752-761, 2012.
- KIM, H.Y.; CHOI, J.H.; KANG, Y.J. et al. Reparixin, an inhibitor of CXCR1 and CXCR2 receptor activation, attenuates blood pressure and hypertension-related mediators expression in spontaneously hypertensive

rats. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 34, n. 1, p. 120-127, 2011.

LEITNER, J.M.; MAYR, F.B.; FIRBAS, C., et al. Reparixin, a specific interleukin-8 inhibitor, has no effects on inflammation during endotoxemia. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007 Jan-Mar;20(1):25-36.

LOFTUS, J.P.; BELKNAP, J.K.; BLACK, S.J.; Matrix metalloproteinase-9 in laminae of black walnut extract treated horses correlates with neutrophil abundance. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* v. 113, n. 3-4, p. 267-276, 2006.

LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; PETTIGREW, A. et al. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut- induced laminitis. *Am J Vet Res.*, v. 68, n. 11, p. 1205-1211, 2007.

LOFTUS, J.P.; JOHNSON, P.J.; BELKNAP, J.K., et al. Leukocyte-derived and endogenous matrix metalloproteinases in the lamellae of horses with naturally acquired and experimentally induced laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.* v.15, n.129, p.221-30, 2009.

MAIER, R.V. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome—endotoxin, inflammatory cells, and their mediators: cytokines and reactive oxygen species. *Surg. Infect.* v. 1, p. 197-204, 2000.

MARSH, D.R.; FLEMMING, J.M. Inhibition of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptors attenuates acute inflammation, preserves gray matter and diminishes autonomic dysreflexia after spinal cord injury. *Spinal Cord.*, v. 49, n. 3, p. 337-344, 2011.

MIDGLEY I, FITZPATRICK K, WRIGHT SJ. et al. Species differences in the pharmacokinetics and metabolism of reparixin in rat and dog. *Xenobiotica.* v.36, n.5, p.419-40, 2006.

MORICONI, A.; CESTA, M.C.; CERVELLERA, M.N., et al. Design of Noncompetitive Interleukin-8 Inhibitors Acting on CXCR1 and CXCR2. *J. Med. Chem.* v.50, p. 3984-4002, 2007.

MUKAIDA, N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, v. 284, p. 566-577, 2003.

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

POLLITT, C.C. Conferência Anual da ABRAVEQ, 8, 2007a, São Paulo. The horse's foot – the inside story. São Paulo, ABRAVEQ, 2007, 29 p. Disponível em: [www.abraveq.com.br](http://www.abraveq.com.br). Acesso em: 04/12/2012.

POLLITT, C.C. Conferência Anual da ABRAVEQ, 8, 2007b, São Paulo. Laminitis Theory. Shots around the target. São Paulo, ABRAVEQ, 2007, 15 p. Disponível em: [www.abraveq.com.br](http://www.abraveq.com.br). Acesso em: 04/12/2012.

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

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Research Review*, v. 60, p. 57-64, 2009.

SOUZA D.G.; BERTINI R.; VIEIRA A.T. et al. Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br J pharmacol.* v.143, n.1, p.132-142, 2004.

STEWART A.J.; PETTIGREW A.; COCHRAN, A.M. et al. Indices of inflammation in the lung and liver in the

early stages of the black walnut extract model of equine laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.* v.129, n. 3-4, p. 254-260, 2009.

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

VILLA, P.; TRIULZI, S.; CAVALIERI, B. et al. The Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) Receptor Inhibitor Reparixin Improves Neurological Deficits and Reduces Long-term Inflammation in Permanent and Transient Cerebral Ischemia in Rats. *Mol Med*, v.13, n. 3-4, p. 125-133, 2007.

VISSER, M.B.; POLLITT, C.C. Lamellar leukocyte infiltration and involvement of IL-6 during oligofructose-induced equine laminitis development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2011), doi:10.1016/j.vetimm.2011.07.016

WAGUESPACK, R.W.; COCHRAN, A.; BELKNAP, J.K., Expression of the cyclooxygenase isoforms in the prodromal stage of black walnut-induced laminitis in horses. *Am. J.Vet. Res.*v 65, p. 1724–1729, 2004a.

WAGUESPACK, R.W., KEMPPAINEN, R.J., COCHRAN, A., et al. Increased expression of MAIL, a cytokine-associated nuclear protein, in the prodromal stage of black walnut-induced laminitis. *Equine Vet. J.* v.36, p. 285–291, 2004b.

WOODMAN, L.; SUTCLIFFE, A.; KAUR D. et al. Chemokine concentrations and mast cell chemotactic activity in BAL fluid in patients with eosinophilic bronchitis and asthma, and in normal control subjects. *Chest.*, v. 130, n. 2, p. 371-378, 2006.

ZARBOCK, A.; ALLEGRETTI, M.; LEY, K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. *Br J Pharmacol.*, v. 155, n. 3, p. 357-364, 2008.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da laminite equina se expandiu consideravelmente na última década em virtude de perdas importantes na equideocultura mundial. Contudo, a reprodução experimental da doença enfrenta consideráveis limitações. A origem multifatorial e as interfaces de diversos mecanismos fisiopatológicos raramente são reproduzidas nos indivíduos experimentais. Assim, os resultados obtidos por um determinado modelo devem ser interpretados com cautela quando se deseja extrapolar para os casos clínicos de ocorrência natural. A homogeneidade dos indivíduos amostrais também tem sido um importante problema. Recursos financeiros escassos impedem, em muitas ocasiões, a aquisição de animais padronizados com relação à raça, idade, peso, origem e sexo. Isso acaba por acrescentar fontes de variação que tornam a interpretação dos resultados mais difíceis. Em nosso estudo, observamos que os cavalos mais leves desenvolveram laminite clinicamente mais branda. Contudo o pequeno número de animais não permitiu inferências estatisticamente comprovadas.

O estudo por meio de biópsias seriadas utilizado nesse experimento tem como vantagem a diminuição do número de animais e da variação individual. Contudo, a obtenção de tecidos preservados e em quantidades suficientes deve ser associada a um método de fácil execução e de boa tolerância pelos animais. A claudicação e a hemorragia decorrente dos procedimentos de biópsia podem acrescentar importantes confundimentos aos resultados de análises clínicas e laboratoriais. Da mesma forma, a distorção estrutural sofrida pela amostra durante a obtenção pode limitar o estudo de aspectos importantes do tecido lamelar. Assim, como aconselhamento a futuras investigações utilizando biópsias lamelares,

é importante considerar o desenvolvimento de uma técnica que ofereça as vantagens acima citadas.

Embora se reconheça a participação deletéria da inflamação na laminite, estudos demonstraram que a utilização de anti-inflamatórios convencionais pouco interfere no prognóstico. Os resultados obtidos com essa pesquisa indicam que o antagonismo dos receptores CXCR1 e CXCR2 pode oferecer alguma proteção ao tecido lamelar de cavalos acometidos pela doença. Mais do que isso, esse estudo abre uma ampla perspectiva ao estudo de uma nova classe de medicamentos destinados a inibição da resposta inflamatória de uma forma independente do mecanismo das ciclooxigenases.

As pequenas, embora significativas, diferenças entre grupos encontradas nessa pesquisa se traduzem em fortes evidências da ação da reparixina sobre o tecido lamelar dos eqüinos. Isso se baseia no fato das análises histológicas e de biologia molecular terem sido conduzidas em laboratórios diferentes e com pesquisadores totalmente alheios à ordem das amostras.

Uma vez demonstrada a efetiva inibição da quimiotaxia de neutrófilos no tecido lamelar, um objetivo frustrado no presente estudo, será possível esclarecer o verdadeiro papel da infiltração leucocitária na fase inicial da laminite. Assim, futuras investigações envolvendo a quimiotaxia de neutrófilos eqüinos *in vivo* e *in vitro* devem ser conduzidas utilizando reparixina e outros fármacos.

Por fim, é importante esclarecer que as conclusões a que chegamos não têm a pretensão de alardear a descoberta de uma

droga capaz de prevenir a laminite equina. Em vez disso, notificamos que a reparixina e outros fármacos análogos merecem a atenção da comunidade científica.