

Universidade Federal de Minas Gerais

Alvaro de Paula Lage de Oliveira

Células tronco mesenquimais autólogas infundidas por perfusão regional
venosa na terapia da laminite crônica em equinos

Belo Horizonte
2019

Universidade Federal de Minas Gerais

Alvaro de Paula Lage de Oliveira

Células tronco mesenquimais autólogas infundidas por perfusão regional
venosa na terapia da laminite crônica em equinos

Tese apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal
da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em
Medicina Veterinária.

Área de concentração: Clínica e
Cirurgia Veterinárias.

Prof. Orientador: Rafael R. Faleiros.

Belo Horizonte
2019

Oliveira, Alvaro de Paula Lage de.

Células tronco mesenquimais autólogas infundidas por perfusão regional venosa na terapia da laminite crônica em equinos [manuscrito] / Alvaro de Paula Lage de Oliveira. - 2019.

137 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Rafael R. Faleiros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

1. Equino - Teses. 2. Flebografia - DeCS. 3. Terapia tecidual - DeCS. 4. Histologia. 5. Laminite - Tese. I. Faleiros, Rafael Resende. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

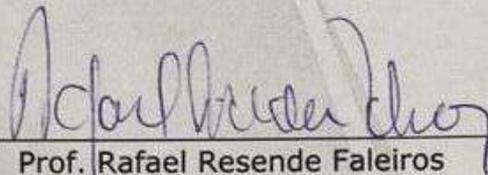
CDD: 636.089

FOLHA DE APROVAÇÃO

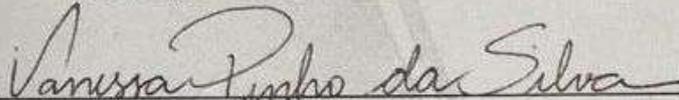
ALVARO DE PAULA LAGE DE OLIVEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

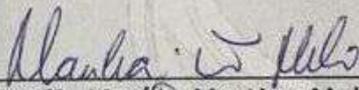
Aprovada em 30 de Abril de 2019 , pela banca constituída pelos membros:



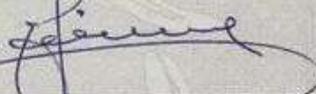
Prof. Rafael Resende Faleiros
Presidente - Orientador



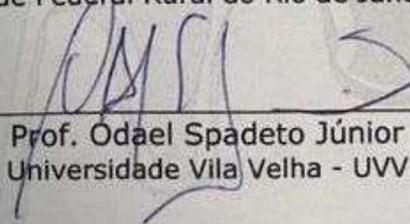
Profª. Vanessa Pinho da Silva
Instituto de Ciências Biológicas - ICB-UFMG



Profª. Marília Martins Melo
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Leonardo Rodrigues de Lima
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ



Prof. Odael Spadeto Júnior
Universidade Vila Velha - UVV

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro
passo para vitória é o desejo de vencer”
Mahatma Gandhi.

Dedicatória

*Primeiramente a Deus, aos meus pais, responsáveis por todo apoio,
carinho e amor fundamentais a este caminho percorrido até aqui.
Vocês são os meus verdadeiros exemplos de vida!*

*Aos meus irmãos que mesmo na distância, física ou não, sempre me
deram carinho e estiveram presentes, tornando os obstáculos da
vida menos dolorosos.*

*À minha vó, uma pessoa que amo muito, responsável por minha
educação, a base de tudo!*

À minha noiva Júlia, o grande amor da minha vida!

*À Tia Katia (in memoriam), sempre com uma palavra de sabedoria,
minha estimuladora e responsável por eu chegar até aqui.
Eterna saudade!*

Agradecimentos

Obrigado **Deus** por me dar forças e me guiar por este caminho! Devo tudo ao Senhor!

Agradeço aos meus pais **Silas e Jussara** por tudo! Sem eles nada disso seria possível! A base de tudo!

Agradeço a minha noiva **Júlia**, mulher que eu escolhi para caminhar ao meu lado. Obrigado por todas palavras de apoio, e por ter tanta paciência comigo!

Ao meu orientador professor **Rafael Resende Faleiros**, uma pessoa de grande sabedoria, diretriz do meu aprendizado humano e profissional, obrigado pelos anos de convivência, pelas conversas sempre proveitosas, pelos cafés da manhã sempre muito agradáveis, por me ensinar o verdadeiro significado de ser Veterinário e amar a profissão. Você me ensinou tantas coisas importantes que nenhum livro ensina, serei sempre grato por ter me acolhido como filho.

Ao **Prof. Geraldo Eleno**, um grande homem, um grande amigo, obrigado por todos ensinamentos e palavras de sabedoria.

Ao meu amigo **Odael**, meu primeiro orientador, profissional que admiro muito e que está sempre por perto, disposto a oferecer uma palavra amiga, o meu agradecimento por todo o apoio oferecido. Um grande amigo.

À **Profª. Betânia**, pessoa que tanto me ensinou possibilitando a abertura de tantas portas ao longo de minha caminhada profissional. Agradeço por todo apoio material, intelectual e logístico. Certamente serei sempre grato por tudo!

À **Profª. Britta Leise**, por ter me recebido de forma tão especial e tornado meu doutorado sanduiche uma experiência incrível. Mais que uma orientadora, uma amiga!

À **Profª. Marília** pelo apoio laboratorial durante o experimento e pelas dicas e incentivo nas fases de qualificação.

À **Profª. Vanessa Pinho** que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho, me disponibilizando o Laboratório, me enriquecendo profissionalmente, e pelos bate-papos sempre muito agradáveis.

Ao **Prof. José Dias**, por ter colaborado como co-orientador e estimulado a formação deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa que viabilizou meus estudos tanto aqui no país, quanto durante o doutorado sanduiche.

À **direção da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais** pela autorização para utilização das instalações.

Aos meus **tios, tias, primos e primas**, que mais uma vez me apoiaram, foram pacientes e compreenderam a minha ausência no dia a dia e em diversas datas importantes.

Ao meu amigo **Cahuê**, sempre sistemático, porém de um coração sem tamanho. Você foi a pessoa que mais me ajudou em tudo e eu nunca me esquecerei disso. Muito obrigado!!!

Aos verdadeiros amigos que ganhei neste doutorado, **Bruno, Jaci, Sérgio, Patrícia, Heloíza e Letícia**. Meu verdadeiro e sincero agradecimento!!

Ao meu amigo **Marcão!!** Você esteve comigo até o final de meu experimento sempre me motivando e fazendo as coisas darem certo. Serei sempre muito grato por tudo!

Aos alunos **Isabelle Colen, Thairê, Auana, Fantini, Ana Ferreira, Júlia**, que auxiliaram na condução do projeto. Vocês foram excepcionais em todos os dias de experimento cuidando dos animais e sabendo-os respeitar.

À **Jerusa**, pessoa especial o qual tive privilégio em conhecer. Sua amizade e companhia estarão sempre em meu coração!

À **Profª. Daniela e Profª. Vivian**, primeiras pessoas que me receberam no ICB-UFMG de forma tão acolhedora, prestando apoio sempre que era preciso, meu muito obrigado!

Aos **Professores Armando e Andressa**, pelas palavras de apoio durante esta etapa de minha vida.

À todos os **alunos do ICB** que me ajudaram, mesmo quando respondiam perguntas simples ou até mesmo permaneciam ali por perto para que eu pudesse utilizar a estrutura, vocês foram muito importantes!

À minha segunda família **Piccoli**, vó **Iza**, tia **Branca** e todos integrantes pelo apoio, carinho e almoços que tornaram dias difíceis mais prazerosos. Também ao **tio Delfim e família**, pessoas especiais em minha vida.

À **Gabriela**, mais que uma amiga, uma irmã.

Aos meus amigos **Carlos e Laura** que tanto me ajudaram me dando força nas horas difíceis dos estudos e da vida.

Aos meus amigos **Vitor Zanotti, Italo e Eduardo**, irmãos que a vida me deu.

Aos funcionários **Carlão, Joãozinho, Luisão e Capelinha**, que tantas vezes ajudaram nos cuidados dos animais e preparativos para realização do estudo.

À diretora do Hospital Veterinário Ricardo Alexandre Hippler - UVV **Prof^a. Bárbara** pela compreensão e apoio durante essa fase final do doutorado.

Aos meus filhos peludos, **Guti, Zafira, Luciano, Theodoro, Mel, Brida, Pitty e Dara** que me mostraram como sou apaixonada por animais, recebendo destes o carinho necessário para que todo este caminho fosse percorrido com ainda mais incentivo.

Um agradecimento especial à **Universidade Federal de Minas Gerais** e ao **Programa de Pós-graduação em Ciência Animal** desta instituição, uma grande honra fazer parte desta escola.

Também não poderia deixar de agradecer aos **animais** que participaram de forma direta ou indireta deste projeto, e que Deus abençoe todos eles.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	23	
2.	OBJETIVO GERAL.....	24	
3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24	
4.	HIPÓTESE.....	25	
CAPITULO 1.....			
LAMINITE EQUINA - UMA BREVE REVISÃO.....			26
1.	INTRODUÇÃO.....	26	
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	27	
2.1	ANATOMIA DO DÍGITO EQUINO.....	27	
2.1.1.	O ESTOJO CÓRNEO.....	27	
2.1.2.	OSTEOLOGIA E ARTROLOGIA.....	28	
2.1.3.	VASCULARIZAÇÃO DO ESTOJO CÓRNEO.....	29	
3.	TIPOS DE LAMINITE.....	30	
3.1	ESTÁGIOS DA LAMINITE.....	31	
3.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DA LAMINITE.....	32	
3.3	SINAIS CLÍNICOS.....	33	
3.3.1.	FASE AGUDA.....	33	
3.3.2.	GRAU OBEL.....	34	
3.3.3.	FASE CRÔNICA.....	34	
3.4	FISIOPATOLOGIA DA LAMINITE.....	35	
3.4.1.	MECANISMOS ISQUÊMICOS.....	35	
3.4.2.	MECANISMOS ENZIMÁTICOS.....	37	
3.4.3.	MECANISMOS ENDÓCRINOS E METABÓLICOS.....	37	
3.4.3.	MECANISMOS INFLAMATÓRIOS.....	39	
3.5	DIAGNÓSTICO.....	40	
3.5.1.	RADIOLOGIA.....	40	
3.5.2.	VENOGRAFIA DIGITAL.....	40	
3.5.2.1.	ARCO TERMINAL.....	41	
3.5.2.2.	PLEXO CORONÁRIO.....	42	
3.5.2.3.	VASOS SUBLAMELARES.....	42	
3.5.2.4.	VASOS CIRCUNFLEXOS.....	43	
3.5.2.5.	VASCULARIZAÇÃO DOS TALÕES.....	43	

3.5.2.6. JUNÇÃO CIRCUNFLEXA-LAMELAR.....	43
3.6 TRATAMENTO.....	44
3.6.1. TERAPIA MEDICAMENTOSA.....	44
3.6.1.1. TERAPIA ANTI-INFLAMATÓRIA.....	44
3.6.1.2. TERAPIA ANTIOXIDANTE.....	44
3.6.1.3. VASODILATADORES E ANTICOAGULANTES.....	45
3.6.1.4. CONTROLE DA DOR.....	46
3.6.1.5. MODULAÇÃO DE SENSIBILIDADE À INSULINA....	47
3.6.1.6. MANEJO CORRETIVO DO ESTOJO CÓRNEO.....	47
3.6.1.7. TERAPIA REGENERATIVA – CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....	47
4. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA MEDICINA VETERINÁRIA EQUINA.....	48
4.1 APLICABILIDADE DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA LAMINITE EM EQUINOS.....	49
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

CAPÍTULO 2.....	
AVALIAÇÕES RADIOGRÁFICA, VENOGRÁFICA E DA TAXA DE CRESCIMENTO DO ESTOJO CÓRNEO EM EQUINOS COM LAMINITE CRÔNICA TRATADOS COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO.....	59
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
2.1 SELEÇÃO E DESCRIÇÃO DE CASOS CLÍNICOS.....	62
2.2 AVALIAÇÃO DA CLAUDICAÇÃO.....	62
2.3 PERÍODO DE OBSERVAÇÃO E TRATAMENTO INICIAL.....	62
2.4 COLHEITA DE TECIDO ADIPOSEO E CULTURA CELULAR....	64
2.5 DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	66

2.6	PREPARO DAS CÉLULAS PARA INFUSÃO EM SOLUÇÃO NACL 0,9%.....	67
2.7	SEGURANÇA DE PROCEDIMENTOS CLÍNICOS.....	67
2.8	VENOGRAFIA DIGITAL.....	68
2.9	CRESCIMENTO DO ESTOJO CÓRNEO E EXAMES RADIOGRÁFICOS.....	71
2.10	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ESPACIAL ENTRE A FALANGE DISTAL E O ESTOJO CÓRNEO.....	72
2.11	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
3.	RESULTADOS.....	74
3.1	CULTURA CELULAR E DIFERENCIAÇÃO DAS ADCTM.....	75
3.2	SEGURANÇA DE PROCEDIMENTOS CLÍNICOS.....	77
3.3	EFICÁCIA E RESULTADO DA TERAPIA.....	77
	3.3.1. ANÁLISE VENOGRÁFICA.....	77
	3.3.2. TAXA DE CRESCIMENTO DO ESTOJO CÓRNEO.....	80
	3.3.3. RELAÇÃO ESPACIAL ENTRE A FALANGE DISTAL E O ESTOJO CRÓNEO.....	80
4.	DISCUSSÃO.....	86
5.	CONCLUSÃO.....	90
6.	REFERÊNCIAS.....	90

CAPÍTULO 3.....	
EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSOS NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LÂMINAS DO ESTOJO CÓRNEO DE EQUINOS COM LAMINITE.....	94
RESUMO.....	94
ABSTRACT.....	95
1. INTRODUÇÃO.....	96
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	98
2.1 SELEÇÃO E DESCRIÇÃO DE CASOS CLÍNICOS.....	98
2.2 AVALIAÇÃO DA CLAUDICAÇÃO.....	98

2.3	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO E TRATAMENTO INICIAL.....	99
2.4	COLHEITA DE TECIDO ADIPOSEO E CULTURA CELULAR....	100
	2.4.1. DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	101
	2.4.2. PREPARO DAS CÉLULAS PARA INFUSÃO EM SOLUÇÃO NA _{CL} 0,9%.....	101
2.5	BIÓPSIA DO ESTOJO CÓRNEO.....	102
2.6	CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA LAMELAR E HISTOMORFOMETRIA.....	103
2.7	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA P63.....	104
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	105
3.	RESULTADOS.....	106
3.1	CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA LAMELAR E HISTOMORFOMETRIA.....	106
3.2	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA P63.....	122
4.	DISCUSSÃO.....	125
5.	CONCLUSÃO.....	128
6.	REFERÊNCIAS.....	129

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÕES RADIOGRÁFICA, VENOGRÁFICA E DA TAXA DE CRESCIMENTO DO ESTOJO CÓRNEO EM EQUINOS COM LAMINITE CRÔNICA TRATADOS COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO.....

Tabela 1. Escore de avaliação de achados venográficos em cavalos com laminite crônica..... 70

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LÂMINAS DO ESTOJO

CÓRNEO DE EQUIOS COM LAMINITE.....

Tabela 1. Características histopatológicas do tecido lamelar de equinos com laminite (A1-A6) do grupo adCTM pós-tratamento..... 107

Tabela 2. Características histopatológicas do tecido lamelar de equinos com laminite (A1-A6) do grupo placebo pós-tratamento..... 107

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÕES RADIOGRÁFICA, VENOGRÁFICA E DA TAXA DE CRESCIMENTO DO ESTOJO CÓRNEO EM EQUIOS COM LAMINITE CRÔNICA TRATADOS COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO.....

Figura 1: Cronologia de realização do experimento..... 64

Figura 2: Solução centrifugada contendo tecido adiposo removida da base da cauda de equinos. Observa-se pellet celular (P1) obtido após a tripsinização..... 66

Figura 3. Venografia digital de equino saudável. Principais locais de avaliação da vasculatura digital. Fonte: Prof. Britta Leise (COMUNICAÇÃO PESSOAL)..... 69

Figura 4: Sequência fotográfica do procedimento de colocação do implante de esferas metálicas. (A) Delimitação do acesso, localizado a 2 cm da coroa dorsal do casco, (B) marcação da profundidade de cada casco, (C) perfuração realizada em um ângulo de 90 graus. (D) Esferas metálicas esterilizadas em autoclave. (E) Colocação do implante de esferas metálicas. (F) Detalhe do implante após finalizado.....

Figura 5. Imagem radiográfica lateromedial de falange distal de membro torácico esquerdo em um equino com laminite crônica. Nota-se a presença de esferas metálicas implantadas para verificar o crescimento de estojo córneo, e o marcador metálico a partir da coroa na muralha dorsal..... 72

Figura 6. Imagem de mensuração radiográfica realizada em estojo córneo de membro torácico de um equino com laminite crônica por meio do software Metron

Hoof Pro após realização de calibração e a marcação livre para ângulo do casco, ângulo da falange, ângulo de rotação, crescimento linear.....	73
Figura 7. Imagem de mensuração radiográfica realizada em estojo córneo de membro torácico de um equino com laminite crônica por meio do software Metron Hoof Pro após realização de calibração e a marcação guiada, gerando resultados para as variáveis afundamento, ângulo palmar, espessura de sola, CF Prox., CF Distal.....	74
Figura 8. Aspecto macroscópico do estojo córneo de equino com laminite crônica. (A) Membro torácico direito 15 dias após terceira infusão de adCTM. (B) Membro torácico esquerdo 15 dias após terceira infusão de NaCl 0,9%.....	75
Figura 9. Fotomicrografias das adCTM diferenciadas em tri-linhagem das adCTM. Na diferenciação osteogênica é possível observar depósito de cálcio corado com Vermelho de Alizarina. Para diferenciação adipogênica nota-se pequenas gotículas de lipídeos presentes no citoplasma celular corados com <i>Oil Red O</i> . Diferenciação condrogênica onde as células foram coradas com <i>Alcian Blue</i> para demonstrar a produção de proteoglicanos mostrados em azul por condrócitos.....	76
Figura 10. Valores médios e desvio padrão de escores para perfusão vascular obtidos por venografia em equinos com laminite crônica pré-tratamento (barra branca) e pós-tratamento (barra escura) com NaCl 0,9% (placebo) por perfusão regional venosa.....	78
Figura 11: Valores médios e desvio padrão de escores para perfusão vascular obtidos por venografia em equinos com laminite crônica pré-tratamento (barra branca) e pós-tratamento (barra escura) com adCTM por perfusão regional venosa. * Diferença significativa entre os tempos no mesmo grupo.....	79
Figura 12: Valores médios e erros-padrão em centímetros (cm) obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação da distância linear entre a coroa do casco e o marcador em equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa.*Diferença significativa entre os tempos A1 e A30 ou D1 e D30 no mesmo grupo. #Diferença significativa nos tempos entre os grupos.....	80
Figura 13: Valores médios e erros-padrão em graus obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para ângulo do casco e ângulo de falange distal em	

equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa. *Diferença significativa entre os tempos A1 e A30 ou D1 e 30 no mesmo grupo. #Diferença significativa nos tempos entre os grupos..... 81

Figura 14: Valores médios e erros-padrão em graus obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para ângulo de rotação e ângulo palmar em equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa. *Diferença significativa entre os tempos A1 e A30 ou D1 e 30 no mesmo grupo. #Diferença significativa nos tempos entre os grupos..... 82

Figura 15: Valores médios e erros-padrão em centímetros (cm) obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para casco/falange proximal e casco/falange distal em equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa *Diferença significativa entre os tempos A1 e A30 ou D1 e 30 no mesmo grupo..... 83

Figura 16: Valores médios e desvio padrão em centímetros (cm) obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para comprimento de falange média e espessura de sola em equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa..... 84

Figura 17: Valores médios e erros-padrão em centímetros (cm) obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para afundamento em equinos com laminite crônica, antes (A1, 30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa..... 85

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSOS NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LÂMINAS DO ESTOJO CÓRNEO DE EQUINOS COM LAMINITE.....

Figura 1: Cronologia de realização do experimento.....	99
Figura 2: Sequência fotográfica de procedimentos de biópsia lamelar com o lamelótomo de Falcão-Faleiros mostrando a demarcação do local da biópsia (A), o desbaste do tecido queratinizado com um cortador plano ligado a uma ferramenta elétrica rotativa (B), a incisão das margens internas com um bisturi (C-D), a inserção e o avanço do lamelótomo (E). Amostra obtida (F).....	103
Figura 3: Valores médios e erros-padrão dos graus de lesões histológicas globais no tecido lamelar de equinos com laminite crônica no grupo placebo nos períodos pré e pós-tratamento.....	108
Figura 4: Valores médios e erros-padrão dos graus de lesões histológicas globais no tecido lamelar de equinos com laminite crônica no grupo adCTM nos períodos pré e pós-tratamento.....	108
Figura 5: Valores médios e erros-padrão dos graus de lesões histológicas globais no tecido lamelar de equinos com laminite crônica pré-tratamento distribuídos em grupo adCTM ou placebo.....	109
Figura 6: Valores médios e erros-padrão dos graus de lesões histológicas globais no tecido lamelar de equinos com laminite crônica pós-tratamento distribuídos em grupo adCTM ou placebo.....	110
Figura 7: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 4 pré-tratamento MTE placebo). Observa-se LES apresentando colapso (setas pretas). Barra = 100 μ m.....	111
Figura 8: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 6 pré-tratamento MTE placebo). Observa-se lesão em membrana basal (separação) (setas vermelhas). Barra = 500 μ m.....	112
Figura 9: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 1 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se LEP apresentando	

encurtamento, afinamento e distorção, ausência de LES e o eixo queratinizado (setas pretas). Também observa-se hiperqueratose em camada entre os extratos lamelares médio e interno (triângulo) e ao redor dos túbulos presentes no extrato médio (círculos vermelhos). Barra = 200 µm.....	113
Figura 10: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 1 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se hiperplasia de extrato lamelar (linha preta) e hiperqueratinização ao redor de túbulos em extrato médio (círculos vermelhos). Barra = 500 µm.....	114
Figura 11: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 5 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se ausência de eixo queratinizado, distorção e encurtamento de LEP (pontos pretos), ilhas epidérmicas isoladas (círculo vermelho). Barra = 200 µm.....	115
Figura 12: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 3 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se ilhas dermais abaxiais isoladas (setas pretas). Barra = 400 µm.....	115
Figura 13: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 3 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se ilhas epidérmicas isoladas (círculos vermelhos). Barra = 400 µm.....	116
Figura 14: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 5 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se hiperqueratinização ao redor de túbulos em extrato médio (setas pretas). Barra = 200 µm.....	117
Figura 15: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica 45 dias após o início do tratamento com adCTM ou placebo (à esquerda membro placebo e a direita membro adCTM). Nota-se nítida diferença entre as arquiteturas lamelares. No membro placebo observa-se redução da espessura do extrato lamelar que apresenta LEP encurtadas, ausência de LES e eixo queratinizado e marcada hiperplasia de extrato médio. Verifica-se ainda intensa hiperqueratose entre o extrato médio e lamelar e ao redor dos túbulos. A direita membro adCTM demonstrando arquitetura lamelar mais preservada com LEP homogêneas, presença de eixo queratinizado e LES. A hiperqueratose e a hiperplasia de extrato lamelar são pouco evidentes. Barra = 1000 µm.....	118

Figura 16: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica 45 dias após o início do tratamento com adCTM ou placebo (à esquerda membro placebo e a direita membro adCTM). Nota-se nítida diferença entre as arquiteturas lamelares. No membro placebo observa-se falta de homogeneidade lamelar epidérmica, grau de encurtamento ou distorção das lamelas epidérmicas primárias, presença de hiperplasia do extrato médio. A direita membro adCTM demonstrando arquitetura lamelar mais preservada com LEP homogêneas, presença de eixo queratinizado e LES. Barra = 1000 μm 119

Figura 17: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica 45 dias após o início do tratamento com adCTM ou placebo (à esquerda membro placebo e a direita membro adCTM). Nota-se nítida diferença entre as arquiteturas lamelares. No membro placebo à esquerda observa-se redução da espessura do extrato lamelar que apresenta LEP encurtadas, ausência de LES e eixo queratinizado, e marcada hiperplasia de extrato médio. Verifica-se ainda intensa hiperqueratose entre o extrato médio e lamelar e ao redor dos túbulos. A direita membro adCTM demonstrando arquitetura lamelar mais preservada com LEP homogêneas, presença de eixo queratinizado e LES. A hiperqueratose e a hiperplasia de extrato lamelar são pouco evidentes. Barra = 1000 μm 120

Figura 18: Fotomicrografia do fragmento de uma amostra de biópsia de um equino com laminite crônica do membro adCTM no momento basal, submetida à análise histológica e medição do comprimento total de lamela epidérmica. Observe a camada fina de tecido queratinizado no lado direito seguido por várias lamelas epidérmicas primárias no meio e no lado esquerdo derme. Barra = 2000 μm 121

Figura 19: Valores médios e erros-padrão dos comprimentos totais das lamelas epidérmicas primárias em equinos com laminite crônica submetidos a terapia com células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (adCTM) ou placebo (NaCl 0,9%)..... 122

Figura 20: Fotomicrografia do teste realizado em tecido lamelar de animal saudável, sendo possível verificar a presença de células tronco epiteliais basais apresentando imunomarcagem positiva de p63 (setas). Barras = 200 μm 123

Figura 21: Fotomicrografia do tecido lamelar animal 1 (A, B). Em (A), uma amostra de tecido lamelar do membro adCTM em um equino com laminite crônica em momento basal, sendo possível verificar algumas células tronco epiteliais basais

apresentando imunomarcação positiva de p63 (setas). Em (B), o mesmo membro adCTM 45 dias após início do tratamento (setas). Barras = 100 μ m..... 124

Figura 22: Fotomicrografia do tecido lamelar animal 2 (A, B). Em (A), uma amostra de tecido lamelar do membro adCTM em um equino com laminite crônica em momento basal, sendo possível verificar algumas células tronco epiteliais basais apresentando imunomarcação positiva de p63 (setas). Em (B), o mesmo membro adCTM 45 dias após início do tratamento (setas). Barras = 100 μ m..... 125

LISTA DE ABREVIACÃO

- adCTM – Células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.
- AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais.
- A1 – Momento de avaliações iniciais dos animais.
- A30 – Momento de avaliações realizado 30 trinta dias após o momento inicial.
- AT – Arco terminal.
- ADAM – Domínio desintegrina e metaloproteinases.
- ACTH – Hormônio corticotrófico.
- CAT – Células amplificadoras de antígeno.
- CTE – Células tronco epiteliais.
- CTMs – Células tronco mesenquimais.
- COX – Ciclooxigenases.
- COX 1- Ciclooxigenases 1.
- COX-2 – Ciclooxigenases 2.
- D1 – Momento de avaliações iniciais realizado 15 dias após primeira aplicação de adCTM.
- D30 – Momento de avaliações finais realizado 30 dias após o momento inicial (D1).
- DMSO – Dimetilsufóxido.
- DMEM – Meio de cultura Dulbecco MEM.
- DPIP – Disfunção do Pars Intermedia da Pituitária.
- EV-UFMG – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
- FVE-AD – Fração vascular endotelial de tecido adiposo.
- ICB-UFMG – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- IL – Interleucina.
- IL-6 – Interleucina 6.
- IL-8 – Interleucina 8.
- IV – Intravenoso.
- JCL – Junção circunflexa lamelar.
- kg – Quilogramas.

LDP – Lamelas dermais primárias.
LEP – Lamelas epidermais primárias.
LDS – Lamelas dermais secundárias.
LES – Lamelas epidermais secundárias.
LRS – Laminite relacionada à sepse.
LE – Laminite endocrinopática.
LMEC – Laminite por excesso de carga.
LPS – Lipopolissacarídeos.
mg – Miligramas.
MMPs – Matriz de metaloproteinases.
MMP-2 – Matriz de metaloproteinases 2.
MMP-9 – Matriz de metaloproteinases 9.
MHC II – Complexo de histocompatibilidade 2.
PC – Plexo coronário.
PAS – Coloração de Ácido de Shiffer.
P1 – Passagem 1.
P4 – Passagem 4.
ROS – Espécies reativas de oxigênio.
SF – Solução fisiológica NaCl 0,9%.
SME – Síndrome metabólica equina.
SMPL – Síndrome metabólica pré-laminite.
SID – medicação a cada 24 horas.
SFB – Soro fetal bovino.
TLR – Toll like receptor.
TNFa – Fator de necrose tumoral.
TIMPs – Inibidor tecidual de metaloproteinases.
VT – Vascularização dos talões.
VSL – Vasos dorsais sublamelares.
VC – Vasos circunflexos.

RESUMO

A laminite destaca-se dentre as afecções em membros locomotores como principal causa de afastamento de cavalos de suas atividades. Uma possibilidade terapêutica pouco estudada é a utilização de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (adCTM) infundidas por perfusão regional. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos terapêuticos no uso de adCTM autólogas infundidas por meio de perfusão regional da veia digital palmar e compará-los com a infusão de placebo no membro torácico contralateral de equinos em estágio inicial de laminite crônica. A metodologia experimental foi aprovada pelo Comitê de Ética (CEUA/UFMG 282/2016). Foram utilizados seis equinos, Mangalarga Marchador, fêmeas, com peso entre 381 ± 11 kg, com idade média de $8,3 \pm 4,7$ anos, escore corporal 6 ± 1 (escore 1 a 9), atendidos no EV-UFMG, e identificados como portadores de laminite crônica por meio do histórico, confirmados por exame físico e radiográfico, sendo todos classificados com grau 1 a 2 de claudicação Obel. O estudo envolveu a avaliação em dois períodos equivalentes de 30 dias, antes do tratamento e após tratamento. Cada equino recebeu em ambos os membros torácicos três tratamentos com adCTM [2×10^7 células/ suspensa em 3 ml de PBS e completadas até o volume de 20 ml com solução fisiológica NaCl 0,9% (SF) – grupo adCTM], ou placebo (SF – grupo placebo) no mesmo volume infundido por perfusão regional da veia digital lateral por 30 minutos, repetidos a cada 15 dias. Para verificar a perfusão sanguínea do casco, venografias digitais foram realizadas em ambos os membros torácicos. Cada projeção foi avaliada para o nível de preenchimento vascular em locais pré-determinados, pré e pós-tratamento. Como método de avaliação da taxa de crescimento do estojo córneo, foi utilizado o implante de esferas metálicas na muralha do casco, acompanhado por exames radiográficos. Para monitoração do crescimento antes da aplicação de qualquer tratamento, foram realizados dois exames radiográficos com trinta dias de intervalo (A1 e A30). Para se verificar o efeito pleno das adCTM foram considerados dois momentos também com trinta dias de intervalo, um quinze dias após a terceira aplicação de adCTM (D30) e outro trinta dias antes deste momento final (D1). A avaliação da relação espacial entre falange distal e o estojo córneo foi obtida por programa computacional. As amostras de biópsia lamelar foram coradas com hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff, e foram classificadas quanto ao grau de lesão histológico, histomorfometria epidermal lamelar e testadas para um protocolo imunohistoquímico para p63 e analisadas por microscopia pré e pós-tratamento. Considerando a soma dos escores venográficos, houve uma melhora significativa no grupo adCTM 15 dias após a terceira aplicação quando comparado ao exame pré-tratamento ($P < 0,03$). Essa diferença também se manifestou especificamente nas variáveis perfusão de vasos dorsais lamelares (VDL, $P < 0,03$) e junção circunflexa-lamelar (JCL, $P < 0,03$). O grupo adCTM demonstrou maior distância entre a borda coronária e o ponto de inserção das esferas ao final dos tratamentos (D30) comparado ao grupo placebo ($P < 0,03$). Sobre a relação espacial entre a falange distal e o estojo córneo, efeitos positivos também foram verificados nos membros tratados com adCTM, promovendo maior estabilidade da falange distal comparado ao grupo placebo. Os resultados das análises do grau de lesão histológica global em tecido lamelar pré e pós-tratamento demonstraram piora no escore global do grupo placebo ($P = 0,01$), com destaque para perda do eixo

queratinizado ($P = 0,0001$), hiperplasia do estrato médio ($P = 0,001$), homogeneidade das lamelas epidérmicas primárias ($P = 0,003$) e hiperqueratose ($P = 0,05$), enquanto o grupo adCTM não houve piora no escore global, havendo apenas um aumento para hiperplasia do estrato médio ($P = 0,05$). Houve diferença entre grupos no escore global pós-tratamento ($P \leq 0,05$), com destaque para a variável ausência de eixo queratinizado ($P \leq 0,01$). Os achados deste estudo demonstraram que o protocolo de três aplicações intravenosas de 2×10^7 por perfusão regional no dígito de equinos com laminite crônica estável promove melhorias na perfusão vascular, na taxa de crescimento do casco, na relação espacial entre casco/falange distal, no processo cicatricial lamelar apenas no casco tratado com adCTM, não verificando o mesmo efeito benéfico no grupo placebo.

Palavras chaves: Equino, venografia, terapia celular, histologia, laminite.

ABSTRACT

Laminitis stands out among the affections in locomotive limbs as the main cause of the removal of horses from their activities. A little studied therapeutic possibility are the mesenchymal stem cells. The objectives of this study were to evaluate blood perfusion, hoof growth rate and spatial relationship between the hoof capsule and the distal phalanx of horses with chronic laminitis and who were treated with adCTM infused by regional perfusion in the digital vein in the thoracic limb comparing with the contralateral limb infused with placebo solution, describe the histopathological findings of horses with chronic laminitis and classify the degree of injury pre- and post-treatment with adCTM or placebo; to evaluate epidermal lamellar histomorphometry before and after treatment with adCTM or placebo; to test the immunohistochemical protocol for the p63 antibody (progenitor epithelial cells) in lamellar samples of healthy horses with chronic laminitis. Additionally, a possible systemic effect of adCTM was observed comparing the results obtained from the infused member with those of the contralateral limb (placebo). The experimental methodology was approved by the Ethics Committee (CEUA / UFMG 282/2016). Six equines, Mangalarga Marchador, females, weighing between 381 ± 11 kg, with mean age of 8.3 ± 4.7 years, body score 6 ± 1 (score 1 to 9), attended at HV-UFMG, and identified as having chronic laminitis through history, confirmed by physical and radiographic examination, all of them being classified as grade 1 to 2 of claudication Obel. The study involved the evaluation in two equivalent periods of 30 days, before treatment and after treatment. Each horse received three treatments with adCTM [2×10^7 cells / suspended in 3 ml of PBS and completed to the volume of 20 ml with 0.9% NaCl (SF) - adCTM group] or placebo (SF - placebo group) in the same volume infused by regional perfusion of lateral digital vein for 30 minutes, repeated every 15 days. To verify the blood perfusion of the hoof, digital venographs were performed on both thoracic limbs. Each projection was evaluated for the vascular filling level at pre-determined, pre and post-treatment sites. As a method of evaluating the growth rate of the hoof capsule, the metal spheres were implanted in the wall of the hoof, accompanied by radiographic examinations. For growth monitoring before the application of any treatment, two radiographic exams were performed with a thirty-day interval (A1 and A30). In order to verify the full effect of the

adCTM, two moments were also considered with a thirty-day interval, one fifteen days after the third application of adCTM (D30) and another thirty days before this final moment (D1). The evaluation of the spatial relationship between the distal phalanx and the hoof capsule was obtained by computer program. Samples of lamellar biopsy were stained with hematoxylin-eosin and periodic acid from Schiff, and were classified according to degree of histological lesion, epidermal lamellar histomorphometry and tested for an immunohistochemical protocol for p63 and analyzed by pre and post-treatment microscopy. Considering the sum of the venography scores, there was a significant improvement in the adCTM group 15 days after the third application when compared to the pretreatment test ($P < 0.03$). This difference was also manifested specifically in the variables perfusion of lamellar dorsal vessels (LDV, $P < 0.03$) and circumflex-lamellar junction (CLJ, $P < 0.03$). The adCTM group showed a greater distance between the coronary border and the insertion point of the beads at the end of treatments (D30) compared to the placebo group ($P < 0.03$). On the spatial relationship between the distal phalanx and the hoof capsule, positive effects were also observed in the limbs treated with adCTM, promoting stability of the distal phalanx compared to the placebo group. The results of analyzes of the degree of global histological lesion in pre and post-treatment lamellar tissue showed a worsening in the overall score of the placebo group ($P = 0.01$), with emphasis on keratinized axis loss ($P = 0.0001$), hyperplasia ($P = 0.001$), homogeneity of the primary epidermal lamellae ($P = 0.003$) and hyperkeratosis ($P = 0.05$), while the adCTM group did not present a worsening in the overall score, with only an increase in mean stratum hyperplasia ($P = 0.05$). There was a difference between groups in the global post-treatment score ($P \leq 0.05$), especially the absence of keratinized axis ($P \leq 0.01$). The findings of this study demonstrated that the protocol of three intravenous injections of 2×10^7 per regional perfusion in the digit of horses with stable chronic laminitis promotes improvements in vascular perfusion, hoof growth rate, spatial relation between hoof capsule / distal phalanx in the process scar tissue only on the hoof treated with adCTM, not verifying the same beneficial effect in the placebo group.

Key words: Equine, venography, cell therapy, histology, laminitis.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Xenofonte (380 AC) pode ter sido o primeiro a escrever sobre a laminite que na época ocorria pela ingestão de excesso de cevada e, já nesse tempo, o autor citava que a doença seria mais fácil de tratar no início do seu curso. Aristóteles (330 AC) mencionou a laminite em cavalos que eram criados de forma extensiva oriunda de pastagem. No seu relato ele já mencionava a perda dos cascos dos animais acometidos. Sem imaginar Xenofonte e Aristóteles já descreviam o que na atualidade os pesquisadores identificam como laminite de caráter inflamatório e laminite por ingestão de pasto viçoso (Heymering, 2010).

A laminite é uma enfermidade secundária do dígito do equino que resulta em falência estrutural do mecanismo de aderência do estojo córneo ao esqueleto apendicular podendo progredir para fase crônica (Noschka et al., 2009a, Eades, 2010b; Pollit & Visser, 2010; Karikoski et al., 2015). Ela possui, como sinal patognomônico da fase crônica, a formação de tecido lamelar em “cunha”, termo utilizado para descrever os tecidos patológicos que compõe a região lamelar (extrato lamelar). Esta alteração consequente do desenvolvimento da doença também aparece descrita como uma linha branca ectópica (Collins et al., 2010). Dessa maneira, essa enfermidade é uma condição comprometedora para a carreira do equino acometido, provocando perdas financeiras significativas à equideocultura, além das implicações sobre o seu bem-estar (Bailey et al., 2004).

Em geral, a laminite é considerada uma afecção grave que advém de distúrbios gastrointestinais (cólica cirúrgica, colite, duodenite jejunité proximal), respiratórios (pleuropneumonia) e reprodutivos (metrite, retenção de placenta) que resultam em quadro de endotoxemia e resposta inflamatória sistêmica (síndrome da resposta inflamatória sistêmica - SIRS) (Belknap et al., 2009; Belknap, 2010a; Eades, 2010a; Eades, 2010b; Leise et al., 2011; Katz & Bailey, 2012; Tadros et al., 2013), afetando também animais com alterações endócrinas, como portadores da síndrome de cushing, animais obesos ou que recebam altas dosagens de corticoides (Laskoski et al., 2012).

Estima-se que a laminite nos Estados Unidos da América produz prejuízos anuais em torno de milhões de dólares, onde 75% dos animais acometidos ficam com graves sequelas que os impossibilitam de exercer atividades físicas e reprodutivas. É bem verdade que muitas descobertas recentes começam a elucidar a fisiopatologia dessa doença devastadora para o cavalo, bem como, produzir possíveis formas de tratamento.

Outro fator importante e que se deve ter em consideração é que o tratamento da laminite pode se tornar longo e oneroso e, assim, existe uma necessidade urgente para explorar o potencial de novas estratégias preventivas e terapêuticas para pacientes com ou em alto risco de desenvolver essa afecção. Neste contexto, uma modalidade terapêutica que poderia ser empregada seria a aplicação de células tronco mesenquimais (CTM) por meio de perfusão regional venosa.

Esta técnica de terapia celular para laminite vem sendo empregada por diversos profissionais do meio equestre, porém faz-se necessário a realização de estudos mais aprofundados a respeito de seu potencial terapêutico (Schnabel et al., 2013; Morrison et al., 2014). Acredita-se que as CTM promovam uma melhora do crescimento do casco devido ao seu potencial angiogênico, liberação de fatores de crescimento, proliferação celular e diferenciação (Caplan, 2009).

A utilização de CTM autólogas como tratamento da laminite crônica aparece descrita na literatura consultada, porém, existem apenas relatos de casos (Dryden et al., 2013; Schnabel et al., 2013; Morrison et al., 2014). Assim faz-se necessário a realização de estudos controlados para avaliação de seu potencial, podendo-se comprovar ou não que esse é um instrumento viável na terapia de equinos acometidos por esta enfermidade.

2. OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos terapêuticos no uso de adCTM autólogas infundidas por meio de perfusão regional da veia digital palmar e compará-los com a infusão de placebo no membro torácico contralateral de equinos em estágio inicial de laminite crônica.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito terapêutico das adCTM sobre a perfusão sanguínea do casco por venografia digital pré e pós-tratamento em equinos em estágio inicial de laminite crônica.

Verificar o efeito terapêutico das adCTM sobre a taxa de crescimento do estojo córneo por método radiográfico usando um marcador radiopaco fixado na superfície dorsal do casco.

Verificar o efeito terapêutico das adCTM sobre as características do processo cicatricial do tecido lamelar do casco por meio de avaliação histológica e histomorfometria de amostras colhidas por biópsia.

Verificar o possível efeito sistêmico das adCTM comparando o membro tratado com adCTM e o membro tratado com placebo.

Propor um protocolo imunohistoquímico para p63 (marcador de capacidade proliferativa para células tronco epiteliais).

4. HIPÓTESE

A administração das adCTM autólogas infundidas por meio de perfusão regional da veia digital palmar em um dos membros, promove melhorias na perfusão vascular, na taxa de crescimento do casco e na avaliação histológica, tanto no membro tratado (grupo adCTM) quanto no membro placebo (grupo placebo).

CAPÍTULO 1 - LAMINITE EM EQUINOS – REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

Acredita-se que Xenofonte (380 AC) tenha sido o primeiro indivíduo a escrever sobre a laminite, como a uma doença causada pela ingestão de excesso de cevada e relatou sobre haver maior facilidade de tratamento no período inicial da doença. Aristóteles (330 AC), mencionou a laminite como sendo uma doença em equinos criados de forma extensiva a pasto, descrevendo ainda, como um dos sinais clínicos a perda do estojo córneo em alguma fase do desenvolvimento da laminite. De forma curiosa, os fatos relatados por Xenofonte e Aristóteles naquela época podem hoje ser associados a resultados de pesquisas atuais, que podem ser rastreados desde a famosa tese de doutorado publicada por Obel no final dos anos 1940, demonstrando que a laminite em equinos pode estar relacionada à inflamação e à ingestão de pastagens (Heymering, 2010).

A laminite tem sido reconhecida como uma condição dolorosa do casco, que causa claudicação em equinos (Heymering, 2010), que normalmente ocorre de forma secundária a uma enfermidade sistêmica e que pode resultar em falência estrutural do mecanismo de aderência do estojo córneo ao esqueleto apendicular (Noschka et al., 2009a, Eades, 2010b; Pollit & Visser, 2010; Karikoski et al., 2015). A ocorrência da falência com progressão para a fase crônica possui como sinal patognomônico a formação de tecido lamelar em “cunha”, termo este utilizado para descrever os tecidos patológicos que compõe a região lamelar (extrato lamelar) (Collins et al., 2010). Esta alteração consequente do desenvolvimento da doença também aparece descrita como uma linha branca ectópica (Kuwano et al., 2002).

A organização e a composição da estrutura lamelar patológica é considerada inferior ao tecido lamelar saudável (Pollit & Collins, 2003), provocando dor e perda da função locomotora (Belknap et al., 2007), que pode inclusive induzir um estado debilitante que pode evoluir para morte (Katz & Bailey, 2012). Dessa maneira, essa enfermidade é uma condição comprometedora para a carreira do equino acometido, provocando perdas financeiras significativas à equideocultura, além das implicações sobre o seu bem-estar (Bailey et al., 2004).

As principais doenças inflamatórias associadas e que normalmente antecedem a laminite incluem endotoxemia (síndrome da resposta inflamatória sistêmica [SIRS]) e advêm de distúrbios gastrointestinais (cólica cirúrgica, colite, duodenite jejunité proximal), respiratórios (pleuropneumonia), reprodutivos (metrite, retenção de placenta), ingestão do extrato da noqueira preta e ingestão de sobrecarga de carboidratos solúveis (Belknap et al., 2009; Belknap, 2010a; Eades, 2010a; Eades, 2010b; Leise et al., 2011; Katz & Bailey, 2012; Tadros et al., 2013). Ainda, animais com alterações endócrinas, como portadores das síndromes metabólicas (obesidade) e de Cushing ou que receberam altas dosagens de corticoides, estão predispostos ao desenvolvimento dessa afecção (Laskoski et al., 2012).

Estudos epidemiológicos revelam que a laminite ocorre com frequência de 1,5% a 34% (Wylie et al., 2011) e é responsável por aproximadamente 15% dos casos de claudicação em equinos (Huntington et al., 2009), sendo assim considerada uma condição clínica de alta relevância que compromete o bem-estar dos animais (Wylie et al., 2011). Estima-se que a laminite nos Estados Unidos da América produza prejuízos anuais na casa de milhões de dólares e que 75% dos animais acometidos desenvolvam graves sequelas, que os impossibilitam de realizar atividades físicas e reprodutivas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia do dígito equino

2.1.1 O estojo córneo

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. O estojo córneo atua de forma protetora às estruturas internas mais frágeis, absorvendo e distribuindo o impacto recebido pelo membro durante o apoio do peso, permitindo o deslocamento por longas distâncias, mesmo 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, 2007).

O estojo córneo consiste em três camadas: o estrato externo, o estrato médio e o estrato interno. Ele é o principal sistema de suporte de carga do membro equino e sua função, via aparato suspensório da falange distal, transfere forças de reação do solo ao esqueleto apendicular (Pollitt, 2010b). É ainda, dividida topograficamente em região frontal (pinça), laterais ou mediais (quartos) e região palmar/plantar como talões (Konig & Liebich, 2014).

A camada externa consiste numa estreita banda de tecido macio e flexível do casco que une a pele à camada média. É possível palpar a extremidade dura da camada média através do perioplo. É clinicamente considerado um marcador importante uma vez que forma o limite proximal da camada média. Também é o local de realização de radiografias na vista lateromedial, onde coloca-se um marcador radiopaco, que permite estimar a distância vertical entre a parede do casco proximal e o limite do processo extensor da falange distal (Eustace, Emery & Cripps, 2012).

O estrato médio é o mais espesso das três camadas e é caracterizado pela sua estrutura córnea tubular e intertubular (Pollitt, 2004).

O estrato interno, também denominado de lamela epidérmica, estendem entre a superfície da falange distal e a parede interna do casco, suspendendo o esqueleto axial do cavalo e as

estruturas anexadas dentro do estojo córneo. As lamelas são compostas de 500 a 600 dobras verticais de tecido epidérmico queratinizado (lamelas epidérmicas primárias - LEP), que são unidas a parede interna do casco, e dobras interdigitadas do tecido conjuntivo (lamelas dérmicas primárias - LDP) que são unidas a falange distal. Cada dobra das LEP e LDP tem 150 a 200 dobras interdigitadas de lamelas secundárias resultando em uma área de ampliação da interface dermo-epidérmica, aumentando a adesão do estojo córneo ao esqueleto apendicular. As lamelas epidérmicas e dérmicas secundárias (LES/LDS) unem-se a uma membrana basal que é composta por uma rede de fibras de colágeno e lamininas, ancoradas através de hemidesmossomos a células epiteliais basais que residem à margem das lamelas epidérmicas e ligadas a fibras de colágeno de tração das lamelas dérmicas. Estes estão ligados por uma variedade de componentes de matriz extracelular uns aos outros e às integrinas expressas por células em ambos os lados da membrana, assegurando assim a integridade do tecido (Pollitt, 2004).

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 à membrana basal. A membrana basal, comumente identificada através de coloração de PAS (Periodic Acid Schiff), penetra profundamente nas criptas formadas por duas LES, contornando o topo afilado da lamela em direção ao eixo queratinizado (lamela epidermal primária) e a base arredondada voltada para a lamela dérmica primária. A distância entre a membrana basal e o eixo queratinizado é de 1 a 2 células epidermais basais (Pollitt, 2007).

As células basais epidérmicas e a membrana basal, respondem constantemente ao estresse, tensões de crescimento e de locomoção provocadas pela liberação de proteases e inibidores intrínsecos para realizar o “turnover” celular necessário. Este processo enzimático é considerado de fundamental importância com capacidade de destruir componentes responsáveis por manter a ligação entre a falange distal e o interior da parede do estojo córneo, podendo causar graves consequências a saúde dessa estrutura nos equinos. A ativação de proteases lamelares inadvertidamente ou incontrolável em equinos, e sua dependência genérica de um dígito por membro, os tornam unicamente susceptíveis aos efeitos destrutivos da laminite. (van Eps et al., 2012).

A derme altamente vascular, está subjacente à parede do casco e consiste numa matriz densa de tecido conjuntivo firme que contém uma rede de artérias, veias, capilares, nervos sensoriais e vasomotores (Pollitt, 2016).

2.1.2 Osteologia e Artrologia

O estojo córneo é constituído por uma porção da falange média, a falange distal e o osso navicular (Parks, 2017).

A falange distal contém três superfícies: a superfície articular, superfície solear e superfície parietal. A junção da superfície parietal com a solear forma a margem solear, enquanto a junção da superfície articular com a parietal no aspecto dorsal forma a margem coronária ou proximal, parte da qual forma o processo extensor, e a falange distal é formada no aspecto palmar do osso através da junção da superfície solear e articular. As três superfícies convergem na extremidade palmar medial e lateral para formar os processos palmares da falange distal. A superfície parietal tem uma textura rugosa adaptada a ligações com os tecidos moles (primeiramente a derme sublamelar), e também várias perfurações que permitem a passagem de vasos sanguíneos para os tecidos moles adjacentes (derme sublamelar e lamelar) da parede do estojo córneo (Parks, 2017).

A articulação interfalangeana distal é formada por três articulações: uma entre a falange média e a falange distal, outra entre a falange média e osso navicular e por último outra entre a falange média, falange distal e osso navicular (Parks, 2017).

Os ligamentos do membro distal mantêm a posição e a relação apropriada entre os ossos e as cartilagens ungueais comumente denominadas de cartilagens colaterais. Estes ligamentos restringem a amplitude do movimento entre os ossos. Os dois grupos mais importantes de ligamentos da articulação interfalangeana distal são os ligamentos colaterais. Estes são responsáveis por manter a falange média e distal em aposição, e ainda, os ligamentos suspensores do osso navicular que em conjunto com o ligamento ímpar sesamóideo distal mantêm a posição anatômica do osso navicular adjacente ao aspecto palmar da falange média e distal (Parks, 2017).

A flexão e extensão da articulação interfalangeana distal ocorre tanto de forma ativa como passiva. A flexão ativa ocorre após a contração do músculo flexor digital profundo, o qual aumenta a tensão do tendão flexor digital profundo. A porção digital do tendão flexor digital profundo passa sob o aspecto palmar da quartela e sob a superfície flexora do osso navicular para se inserir na superfície flexora da falange distal. A extensão/dorsoflexão ativa da articulação interfalangeana distal segue a contração do músculo extensor digital comum mediado pelo tendão extensor digital comum através da sua inserção do processo extensor da falange distal (Parks, 2017).

2.1.3 Vascularização do casco

O suprimento sanguíneo para o estojo córneo é realizado pelo par de vasos digitais palmares (artérias). A partir de cada artéria digital palmar, os seus ramos estendem-se para as superfícies dorsal e palmar de cada falange e anastomosam-se com os ramos opostos (Parks, 2017).

Adicionalmente, existe um par de artérias coronárias que percorrem a banda coronária dorsalmente e em profundidade onde depois se unem. Na superfície palmar da falange distal, existem ramos pares de artérias digitais palmares que se estendem distalmente para os bulbos

dos talões e para a rasilha. O par de artérias digitais palmares termina no arco terminal (AT), numerosos vasos perfuram a superfície parietal da falange distal para irrigar os tecidos moles não queratinizados que se encontram sobre o estojo córneo (as células basais epiteliais e a derme sublamelar e lamelar) (Parks, 2017). A artéria circunflexa da sola é uma anastomose dos ramos distais do AT e das artérias dorsais da falange distal, responsável por suprir o cório na junção das lamelas distais e a sola periférica próxima à extremidade da falange (Pollitt, 2010b).

De modo geral, a vascularização do estojo córneo pode ser dividida em três zonas: a dorsal proximal, a dorsal distal e a palmar (Goetz, 1987). A irrigação sanguínea para a zona dorsal proximal deriva predominantemente da artéria coronária e da artéria dorsal da falange média e irriga os tecidos moles da banda coronária e a superfície parietal proximal da falange distal (derme lamelar e sublamelar). A perfusão sanguínea na zona dorsal distal é irrigada primariamente através dos vasos que tem origem no AT e perfundem a falange distal. Esta é também irrigada, através das artérias dorsais da falange distal que passam por meio dos sulcos parietais no aspeto abaxial dos processos palmares. Esta zona irriga a lamela distal e a porção dorsal/abaxial da sola. Por fim, a irrigação da terceira zona (palmar) deriva de ramos da artéria palmar digital até aos bulbos dos talões, rasilha e aspeto palmaroaxial da sola. Não existem anastomoses entre a irrigação sanguínea da artéria dorsal e palmar para a sola (Parks, 2017).

O retorno venoso proveniente do dígito é em sua maior parte paralelo à irrigação arterial. Contudo, existem diferenças significativas dentro do estojo córneo que estão relacionadas com a presença de plexos venosos na derme da banda coronária, muralha, sola e rasilha. Adicionalmente, existem numerosas anastomoses venovenosas dentro da substância axial da cartilagem ungueal. A maioria das veias no membro distal não tem válvulas, mas existem válvulas até ao nível dos vasos digitais palmares (Parks, 2017).

Dois veias digitais palmares paralelas encontram-se no forame solear ao nível do osso navicular, formando as veias terminais medial e lateral. Cada veia terminal une-se aos ramos de plexos venosos internos para formar as veias digitais. Estas veias digitais recebem ramos com origem no osso navicular, veia coronária (que drena a região coronária), plexo venoso interno e veia bulbar que recebe sangue dos talões (Kainer & Fails, 2011).

3. TIPOS DE LAMINITE

A definição mais simples de laminite é um distúrbio na ligação entre a falange distal e o interior do estojo córneo, onde a estrutura lamelar, que normalmente mantém suspensa a falange distal, falha. Sem a falange distal apropriadamente unida à parede do casco, o peso do equino e as forças de locomoção deslocam distalmente a falange dentro do estojo córneo, comprometendo a vascularização digital, a derme da sola e banda coronária, causando dor e claudicação característica (Pollitt, 2007; Pollitt, 2008). A estrutura dinâmica do deslocamento distal da falange distal resulta de uma interação complexa de processos

biológicos e biomecânicos, reconhecidos em três padrões de deslocamento: o rotacional, simétrico e assimétrico (Parks, 2017).

A suspensão da falange distal no interior do casco, é dependente da integridade estrutural da junção derme-epiderme lamelar. Na laminite, esta harmonia estrutural é interrompida por dois principais eventos importantes: a falha na aderência entre a camada de células epiteliais basais lamelares da membrana basal subjacente ligada à lamela dérmica, as principais células subjacentes à lamela dérmica, e o alongamento da lamela epidérmica, cujo as células epiteliais da lamela epidérmica secundária parecem perder a sua morfologia normal (Pollitt, 2010b; de Laat et al., 2013).

Os pesquisadores em medicina veterinária vêm apresentando avanços na pesquisa biomolecular nos últimos vinte anos, expandindo a compreensão atual sobre os mecanismos fisiopatológicos da laminite, tanto em seu curso sistêmico quanto local no tecido lamelar. Esses avanços permitiram a classificação da afecção em três categorias: laminite relacionada com sepse (LRS), laminite endócrinopática (LE) e laminite por excesso de carga (LMEC) (Belknap, 2017).

A suspeita de laminite baseia-se no histórico de claudicação em combinação com avaliação física e exame radiográfica. O prognóstico para a recuperação é determinado pela anamnese, exame físico, avaliação radiográfica assim como a resposta a novos tratamentos e técnicas como a biópsia dorsal lamelar (Ribeiro et al., 2017). De forma lamentável, os métodos tradicionais para avaliar a laminite têm limitações e significado discutível. Devemos considerar que, muitas vezes, equinos com claudicação grave poderão não apresentar alterações radiográficas de deslocamento da falange distal. Portanto, uma ferramenta importante e ainda pouco utilizada seria a técnica de venografia. A venografia pode ajudar o veterinário na tomada de decisão sobre o tratamento, ou auxiliar sobre o prognóstico de casos graves em que a eutanásia é recomendada (Rucker, 2017).

3.1 Estágios da laminite

A compreensão da cronologia de desenvolvimento da laminite é de fundamental importância para avaliação clínica do animal, permitindo a monitorização e o aprimoramento terapêutico (D'Arpe & Benardini, 2010). A laminite pode ser classificada em três diferentes fases: desenvolvimento, aguda ou crônica (Belknap, 2017).

A fase inicial de desenvolvimento da laminite, também reconhecida na literatura como fase prodrômica, não está relacionada aos sinais clínicos, mas sim, ao processo que desencadeia a falha na junção lamelar. Esta fase é compreendida entre o início da doença e o aparecimento dos primeiros sinais de claudicação, característicos da laminite (Hood, 1999), e de duração variável (van Eps, 2017).

A fase aguda inicia-se com os primeiros sinais clínicos de claudicação (Hood, 1999). É caracterizada por claudicação em um ou mais membros, aumento da temperatura do casco,

aumento da amplitude do pulso digital e frequente alteração da posição em repouso (Obel, 1948; Baxter, 1994; Hood, 1999). Quando a laminite aguda persiste por mais de 72 horas e existe evidência radiográfica ou física de deslocamento da FD, caracteriza-se a laminite crônica (Hood, 1999). Essa condição usualmente não é reversível e equinos que sobrevivem a um episódio de laminite aguda normalmente apresentam claudicação persistente durante anos. No entanto, alguns equinos não evoluem para a fase crônica, mas parecem recuperar completamente após a fase aguda (van Eps, 2010). A fase crônica é caracterizada por uma cicatrização de tecido inadequada e uma resposta regenerativa aberrante que resulta em displasia e hiperplasia lamelar (Carter et al., 2011). A condição pode ser compensada ou descompensada. A laminite crônica compensada é definida por uma estabilização da falange distal sem maior descida ou rotação e quando novos tecidos da parede ungueal do casco são produzidos. Se a degeneração lamelar e, conseqüentemente, o deslocamento da falange distal continuar, isso é referido como laminite crônica não compensada. Possíveis conseqüências são a penetração da sola pelo osso apendicular, formação de abscessos, osteíte e atrofia óssea ou mesmo descolamento completo da cápsula do casco (Pollitt, 2008; Morrison, 2010).

A condição em que a falange distal desce é comumente referida como "afundamento". Embora este seja geralmente um processo crônico, a falange distal pode afundar em poucos dias em casos muito graves. Portanto, alguns estudos denominam esse tipo particular de laminite "afundamento agudo" (Eustace & Emery, 2009). Esta fase pode perdurar indefinidamente com sinais clínicos que vão desde os persistentes, como claudicação ligeira, dor contínua no casco, degeneração profunda das junções lamelares, decúbito, deformação da parede do casco e até mesmo exungulação da parede do casco (Pollitt, 2008).

3.2 Modelos experimentais de indução da laminite

Com o desenvolvimento de modelos de indução experimentais de laminite, houve um avanço no conhecimento das diferenças fisiopatológicas da laminite. Atualmente a laminite é compreendida como uma doença heterogênea, porém, com o resultado final comum que é a falha estrutural lamelar (Walsh & Bruns, 2017).

O estudo da laminite inflamatória, associada a doenças sistêmicas, vem sendo realizado com modelos de sobrecarga de carboidratos não estruturais (amido de milho e oligofrutose) e extrato de noqueira preta (*Julgans nigra*) (Weiss et al., 1997; Faleiros et al., 2009; Lima et al., 2013). Ainda esta afecção pode também ser induzida em equinos saudáveis via administração de insulina (de Laat et al., 2010 de Laat et al., 2015), em modelo experimental relacionado à laminite conseqüente a alterações endócrinas.

Além disso, outros estudos demonstram que modelos experimentais de obstrução gastrintestinal/isquemia também tem potencial em promover lesões no tecido lamelar (Rio Tinto et al., 2004; Laskoski et al., 2010), fato este comprovado por evidências de que há a ocorrências de mudanças severas no tecido lamelar em equinos com síndrome cólica natural ainda sem sinais clínicos de alteração em aparelho locomotor (Laskoski et al., 2009).

3.3 Sinais clínicos

Os sinais clínicos de laminite mais frequentemente observados são desconforto podal intenso, claudicação e relutância de permanência na posição quadrupedal, com alterações no estojo córneo. Em contrapartida, os sinais podem variar de acordo com o estágio da doença. A fase de desenvolvimento inclui o surgimento de lesões no tecido lamelar do casco, apresentando sinais clínicos sutis, como aumento do pulso digital e alterações associadas à sepse como membranas mucosas congestionadas, taquicardia, aumento do tempo de enchimento capilar, anorexia, hipertermia e redução da motilidade intestinal (Pollitt, 1999; van Eps, 2017).

3.3.1 Fase aguda

A ocorrência de quadros graves de laminite durante a fase aguda podem ser avaliados por graus OBEL. Nesta fase, pode ocorrer estabilização sem rotação ou afundamento da falange distal, e a condição entra na fase subaguda, até o reparo completo do tecido (Hood, 1999).

Equinos são usualmente suspeitos de manifestar laminite quando a doença já progrediu para a fase aguda e os primeiros sinais clínicos podem ser observados. Como os sintomas clínicos nem sempre são patognômicos, uma inspeção cuidadosa e o monitoramento do animal, além de métodos diagnósticos adicionais, como a radiologia, e a detecção de uma doença subjacente podem ser úteis para estabelecer um diagnóstico confiável (van Eps, 2017). Em casos moderados a graves, os equinos terão um aumento da frequência cardíaca, aumento da frequência respiratória, sudorese espontânea e hipertermia leve a grave. Em sua maioria, equinos com laminite nesta fase demonstram comportamento de inquietação, troca de apoio intermitente ou elevação de um dos membros alternadamente, sinais estes causados por sobrecarga de peso no tecido lamelar fragilizado.

A hipertermia em estojo córneo causada por vasodilatação, pode ser detectada na maioria dos equinos que sofrem de laminite durante a fase aguda e, às vezes, até mesmo durante a fase de desenvolvimento da doença (de Laat et al., 2012). A presença de pulso digital aumentado através da palpação das artérias digitais palmares pode ser perceptível em equinos com laminite. O equino deve ser examinado após um período de descanso, pois o exercício ou mesmo alguns passos podem exagerar o pulso digital em animais saudáveis. A postura característica de um equino com laminite é um bom sinal auxílio diagnóstico. Se apenas os membros torácicos são afetados, como é geralmente o caso, devido ao fato de a maior parte do peso corporal (cerca de 65%) serem suportados por estes membros, porque eles carregam cerca de 65% do peso do cavalo, o equino tende a deslocar a carga de peso para os talões. Os membros pélvicos são posicionados sob o abdômen para transferir uma carga maior de peso para estes membros. Quando a laminite ocorre em membros pélvicos, a apresentação clínica de apoio dos membros será invertida (Pollitt, 2008).

A claudicação é frequentemente o primeiro sintoma observado pelo proprietário do equino. A maioria dos equinos reluta em mover-se. Essa situação é comumente descrita como se o equino estivesse "pisando em ovos". Devido o tendão flexor digital profundo exercer tração na falange distal, aumentando assim as forças de cisalhamento que atuam nas lamelas, a fase posterior da passada anterior é mantida o mais curta possível. Durante a caminhada, o equino geralmente coloca os cascos com os talões em primeiro lugar, e mantém a fase de balanço da passada dos membros afetados curta, já que durante esse período o membro contralateral sofre uma carga dupla. Essa é também a razão pela qual os equinos com laminite relutam em erguer um membro anterior ou posterior, respectivamente (Pollitt, 2008).

3.3.2 Grau Obel

Em 1948, o veterinário sueco Nils Obel desenvolveu um sistema de classificação para claudicação de equinos com laminite, baseado na gravidade dos sintomas clínicos. Este sistema identifica quatro graus de claudicação, nomeados após sua autoria. A laminite grau I de Obel descreve o tipo menos severo de claudicação, quando o animal afetado desloca seu peso de uma perna para a outra, mas não demonstra claudicação no ritmo ao passo. Equinos com laminite Obel grau II relutam em permanecer em superfícies duras e claudicam obviamente ao trote (característica de rigidez). No entanto, um equino com claudicação de grau II de Obel não resiste ou demonstra grande desconforto no membro contralateral quando um membro é elevado. Com laminite grau III de Obel, o equino apresenta claudicação, mesmo em ritmo ao passo e, poucas vezes se move voluntariamente. Além disso, o equino resistirá a elevar o membro devido ao aumento da dor no membro contralateral, que teria que suportar o dobro do peso. A laminite grau IV de Obel é o grau mais severo de laminite. O equino fica totalmente relutante em se mover e frequentemente se encontra em decúbito (White, 2005; Pollitt, 2008).

3.3.3. Fase crônica

A fase crônica da laminite equina é caracterizada por um colapso estrutural do aparelho suspensor da falange distal, o cório coronariano, um constituinte da banda coronária, está firmemente preso à cartilagem do estojo córneo, o tecido conjuntivo da banda coronária segue o movimento descendente da falange distal (Pollitt, 2008). Isto cria uma depressão perceptível acima da extensão proximal da banda coronária e a margem acentuada do estojo córneo proximal, perceptível a palpação. A largura e a profundidade dessa depressão supracoronária refletem o grau em que a falange distal afundou (Eustace & Emery, 2009). Ao contrário da depressão descrita, em alguns casos com inflamação intensa, a banda coronária se torna edemaciada, e incha na borda proximal da parede do casco (Rucker, 2010).

O crescimento da muralha dorsal do estojo córneo é prejudicado, levando a um crescimento excessivo se comparado a face palmar/plantar. Flutuações na taxa de crescimento da muralha dorsal criam uma aparência com característica de anéis de crescimento. Estes anéis de crescimento, se desenvolvem paralelamente à coroa, divergem no aspecto palmar/plantar e convergem na região digital. O crescimento retardado contínuo resulta em aparência "abaulada" da muralha dorsal do estojo córneo e, se não for corrigida, a muralha se curvará e crescerá para cima, no que pode ser descrito como "chinelo de Aladim" (Pollitt, 2008; Eustace & Emery, 2009;). Cascos com tal aparência normalmente desenvolvem hiperplasia cicatricial no estrato lamelar, que vem sendo denominado pelo termo "cunha" (Collins et al., 2010).

Devido à pressão exercida pela falange deslocada, a sola perde sua concavidade, tornando-se plana e posteriormente formando uma protuberância convexa sobre a ponta do esqueleto apendicular. Em casos de deterioração, a falange distal pode fazer com que a sola rache, ocasionando exteriorização do cório solear e falange pela sola. A linha branca, transição da muralha dorsal do estojo córneo, torna-se mais espessa, refletindo o espaço crescente entre a superfície dorsal da falange distal e a superfície interna do estojo córneo (White, 2005; Pollitt, 2008; O'Grady, 2010)

3.4 Fisiopatologia da laminite

Resultados experimentais indicam a existência de vários mecanismos envolvidos na patogênese da laminite, resultando na falha da junção dermo-epidérmica, enfraquecimento do tecido lamelar do estojo córneo e rotação ou afundamento da falange distal (Pollitt, 1996; Rio Tinto et al., 2004; Laskoski et al., 2009; Karikoski et al., 2014). Os principais mecanismos apontados são lesões isquêmicas, enzimáticas, endócrinas (metabólicas) e inflamatórias.

3.4.1 Mecanismos isquêmicos

A vasoconstrição e a isquemia podem contribuir para a laminite de diferentes maneiras. Uma consequência da diminuição da perfusão digital é o fornecimento impedido de oxigênio e glicose. No entanto, o metabolismo lamelar parece ser principalmente anaeróbico, portanto a demanda de oxigênio é baixa (Pollitt, 2008). Por outro lado, as lamelas digitais têm uma demanda muito alta de glicose e sua privação leva ao colapso lamelar. Um estudo *in vitro* com explantes lamelares mostrou que o número de hemidesmossomas diminuiu de forma constante até que finalmente desapareceu quando o tecido foi cultivado na ausência de glicose (French & Pollitt, 2004). Não apenas a vasoconstrição, mas também o redirecionamento do sangue através de derivações arteriovenosas dilatadas leva à hipoperfusão digital, pois o sangue pode contornar os leitos capilares do estojo córneo. As

anastomoses arteriovenosas na microcirculação lamelar dérmica são capazes de retirar 50% do fluxo sanguíneo total do membro quando estão completamente dilatadas. A dilatação destas anastomoses também poderia explicar a pulsação das artérias digitais e o aumento da temperatura do estojo córneo durante a fase de desenvolvimento da laminite, enquanto as lamelas digitais sofrem simultaneamente isquemia (Pollitt, 1991).

A isquemia como causa de laminite deu origem à teoria vascular, que atribui as lesões teciduais lamelares originalmente causadas por vasoconstrição digital e/ou aberturas de derivações arteriovenosas no tecido lamelar, desencadeando estase sanguínea e, conseqüentemente, edema e necrose tecidual (Peroni et al., 2005; Noschka et al., 2009b). Existem evidências de que a inflamação sistêmica, e posteriormente a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas, podem causar vasoconstrição digital (Noschka et al., 2009a).

Muitos dos eventos vasculares durante a laminite equina foram elucidados recentemente. O edema lamelar devido à constrição venosa foi um dos primeiros acontecimentos vasculares identificados nas fases iniciais nos modelos induzidos por extrato de noqueira preta e carboidratos (Belknap et al., 2009; Lima et al., 2013).

Este aumento da resistência venosa é simultâneo ao aumento das concentrações de endotelina-1, que provoca vasoconstrição intensa das veias lamelares. Esse efeito vasoconstritor pode ser revertido pela administração de um antagonista de endotelina-1 (Eades, 2010b).

Pesquisadores demonstraram ativação plaquetária e ativação plaquetas-neutrófilos (Lunn & Hurley 2009). A ativação localizada de plaquetas causa vasoconstrição através da liberação de tromboxanos e serotonina, os quais causam constrição de veias, maior que a constrição de artérias lamelares (Lunn & Hurley 2009; Eades, 2010b). Além disso, aminas vasoativas são formadas por bactérias no trato gastrointestinal e podem entrar na circulação contribuindo para a patogênese da laminite (Belknap et al., 2009; Lunn & Hurley 2009; Eades, 2010b). A resistência à insulina altera a função endotelial, podendo criar um estado inflamatório e conduzindo a ativação de plaquetas e leucócitos, levando ao aumento da produção de endotelina, produção de mediadores de inflamação e estresse oxidativo (Eades, 2010a; Eades, 2010b).

Como já visto anteriormente, os eventos iniciais na laminite induzida por extrato de noqueira preta incluem a ativação de moléculas de adesão endoteliais e da migração de leucócitos (Faleiros & Belknap, 2017). Concentrações alteradas de substâncias vasoativas não tem um efeito importante sobre o fluxo sanguíneo regional, mas provavelmente podem interferir na sinalização de células endoteliais e modular suas funções. O resultado final pode ser criação de um estado pró-inflamatório com o aumento do estresse oxidativo, em vez de privação de oxigênio (Belknap et al., 2009; Belknap, 2010a).

Resultados experimentais demonstram a ausência de xantina oxidase, uma enzima liberada durante a isquemia tecidual (Loftus et al., 2007), desafiando a vasoconstrição como o evento primário no desenvolvimento de laminite. Estudos demonstram que a vasodilatação

sublamelar ocorre precocemente no desenvolvimento da doença, o que está associado ao aumento de temperatura e fluxo sanguíneo no tecido lamelar (Pollitt & Davies, 1998) comprovado por cintilografia (Trout et al., 1990), sugerindo que o aumento da irrigação no tecido lamelar pode contribuir para a falha das junções dérmicas epidérmicas. Outros estudos realizados demonstraram que a crioterapia previne a lesão do tecido lamelar após laminite induzida experimentalmente (van Eps & Pollitt, 2004; Dern et al., 2018). No entanto, sabe-se que a redução do fluxo sanguíneo detectada pela venografia ocorre na fase de laminite crônica (Baldwin & Pollitt, 2010).

3.4.2 Mecanismos enzimáticos

Embora estudos relatem a ocorrência de ativação de leucócitos mais rapidamente, há também evidências substanciais de uma aceleração na remodelação enzimática, responsável principalmente pela matriz de metaloproteinases (MMPs), causando a degradação da lamela e colágeno tipo IV e tipo VII, evento este considerado importante durante a laminite juntamente com a elevação a MMP-2 e MMP-9 (Pollitt, 1996; Eades, 2010a; Eades, 2010b).

Testes com PCR revelaram aumento da expressão de MMP-14 concomitantemente com diminuição da quantidade de inibidoras teciduais de metaloproteinases (TIMPs) em equinos com laminite induzida por uso de frutanos (Eades, 2010a; Eades, 2010b; Katz & Bailey, 2012).

Em contraste, a regulação de MMP-2 ocorreu independente da concentração de mieloperoxidase, sugerindo que a desorganização dos níveis de MMP-2 ocorre independente de processos inflamatórios. Um estudo recente também examinou a expressão de genes que codificam proteínas contendo um domínio desintegrina e metaloproteinase (ADAM), bem como genes que codificam os inibidores naturais destas enzimas (TIMPs) em equinos induzidos por sobrecarga de carboidratos, extrato de noqueira preta, e até mesmo quadros clínicos de laminite. A expressão do gene da ADAMTS-4 foi fortemente detectada em quase todos os equinos com laminite induzida experimentalmente e adquirida naturalmente (Eades, 2010a; Eades, 2010b; Katz & Bailey, 2012).

As expressões da MMP-9 e da ADAMTS-5 também foram aumentadas em muitos dos equinos com laminite. Além disso, a expressão do gene TIMP-2 foi diminuída na maioria desses mesmos equinos. A regulação imprópria da matriz extracelular demonstra representar um evento importante em equinos com laminite, seja como parte ou independente dos processos inflamatórios em geral (Eades, 2010a; Eades, 2010b; Katz & Bailey, 2012).

Entretanto, um estudo em equinos com laminite induzidos experimentalmente por sobrecarga de carboidratos, foi evidenciado que as MMP-2 e MMP-9, historicamente associados no desenvolvimento da laminite demonstraram não serem responsáveis por iniciar a patogênese da laminite. Outras proteases como a ADAMTS-4 e reguladores como o TIMP-2 podem estar envolvidos no dano lamelar inicial (Visser & Pollitt, 2012).

O processo de ativação enzimática permanece pouco conhecida, e sugere-se que as toxinas bacterianas absorvidas no trato gastrointestinal e citocinas inflamatórias desencadeadas pela resposta inflamatória sistêmica (ex: TNF- α) possam estar envolvidas neste mecanismo. Dentre as toxinas conhecidas por promover a ativação das MMPs, as exotoxinas das espécies *Streptococcus*, em específico o *Streptococcus bovis*, apresentam destaque neste processo (Pollitt, 1999). Por outro lado, o aumento da substância pode ocorrer como consequência de alterações morfológicas no tecido lamelar e, portanto, não ser a causa da doença (Laskoski et al., 2013).

3.4.3 Mecanismos endócrinos e metabólicos

A síndrome metabólica equina (SME) é caracterizada por resistência à insulina, obesidade ou adiposidade regional (inserção da cauda, prepúcio, região das glândulas mamárias, pescoço) e histórico de laminite (Pollitt, 2008; Frank, 2011). Outros exames de sangue podem revelar um aumento nas concentrações de glicose, insulina e leptina em jejum. Raças de pôneis, ou equinos Morgan, Paso Fino, Árabe, Saddlebred, Quarto de Milha e Tennessee Walking são mais comumente afetados (Frank, 2011). Estudos indicaram uma correlação positiva entre obesidade e medidas radiográficas para laminite em raças Crioulas e Mangalarga Marchador (Paz et al., 2013; Magalhães et al., 2014). Esses resultados indicam que a obesidade desencadeia o enfraquecimento da conexão entre o casco e a falange distal com separação progressiva dessas estruturas.

A SME é frequentemente manifestada clinicamente quando o pônei ou equino é criado extensivamente, podendo desenvolver laminite associado a alimentação de pastagens, ou quando o animal entra em balanço energético negativo (por exemplo, devido a hospitalização) e, conseqüentemente, desenvolve hipertrigliceridemia. Devido à diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos corporais e à conseqüente falta de disponibilidade de glicose intracelular, os equinos resistentes à insulina mobilizam facilmente os lipídios como fonte de energia. Portanto, esses equinos e pôneis são propensos a hiperlipidemia (Frank, 2011).

Em um estudo com pôneis, foi possível identificar padrões de herança dominante para laminite associado a alimentação de pastagens. No entanto, as circunstâncias ambientais e o manejo de um pônei geneticamente inclinado também influenciam a manifestação clínica e o surto de SME. Exercícios regulares e restrições dietéticas podem prevenir ou reduzir a obesidade e, portanto, podem prevenir a laminite em animais suscetíveis. Além disso, neste mesmo estudo foi estabelecido o termo síndrome metabólica pré-laminite (SMPL) para equinos saudáveis que são propensos a desenvolver a SME de acordo com seu fenótipo e antecedentes genéticos (Treiber et al., 2006).

Em um estudo com equinos com SME e doença de Cushing equina, foi evidenciado que as concentrações plasmáticas de insulina estão fortemente correlacionadas com a ocorrência e o grau de laminite. Eles detectaram que o início da laminite estava associado a um nível

plasmático de insulina que excedia 100 μ IU/ml (normalidade considerada entre 8 - 30 μ IU/ml). Curiosamente, a perda de peso não reduziu significativamente os níveis de insulina neste estudo. Em qualquer caso, uma concentração diminuída de insulina pareceu engendrar uma melhoria dos sinais clínicos de laminite (Walsh et al., 2007).

A aparência clínica de equinos que sofrem de SME e aqueles com doença de Cushing (Disfunção do Pars Intermedia da Pituitária - DPIP) pode ser bastante semelhante e é útil testar não apenas a insulina, mas também os níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em caso de dúvida. Considerando que ambas as doenças causam hiperinsulinemia, apenas equinos com DPIP irão mostrar níveis aumentados de ACTH. No entanto, testes metabólicos adicionais devem ser feitos para diagnosticar o DPIP, pois os níveis de ACTH podem sofrer flutuações sazonais e individuais (Walsh et al., 2007).

Experimentalmente foi estabelecido que a relação entre a laminite e as alterações endócrinas são melhor observadas após a indução de laminite por infusão contínua de insulina em pôneis saudáveis (de Laat et al., 2010). Ainda foi demonstrado que a laminite desenvolvida em equinos alimentados com dietas ricas em carboidratos não está diretamente associada a eventos inflamatórios como em outros modelos de indução já estudados. Dessa forma, outras causas de lesão podem estar relacionadas à laminite metabólica (Belknap et al., 2011).

O mecanismo exato pelo qual a SME contribui para o desenvolvimento da laminite crônica ainda não está completamente definido. Alguns acreditam que a resistência à insulina e a hiperinsulinemia resultante estimulam a vasoconstrição e alteram a função endotelial, enquanto a obesidade coloca o corpo em um estado pró-inflamatório (Geor e Frank, 2009).

Equinos com laminite endocrinopática frequentemente sofrem episódios recorrentes de laminite e comumente desenvolvem sintomas graves de laminite crônica. Esses equinos passam por um processo de recuperação apenas lento e podem nunca alcançar sua estabilidade anterior (Walsh et al., 2007).

3.4.4 Mecanismos inflamatórios

Nos últimos anos, a inflamação foi descrita como mecanismo importante na fisiopatogênese da laminite equina (Eades, 2010a; Eades, 2010b). No sítio de desenvolvimento da doença existe um infiltrado leucocitário (Faleiros et al., 2011), com aumento na liberação de citocinas inflamatórias (Tadros et al., 2013), quimiocinas e a ciclooxigenases no tecido lamelar, induzindo migração e adesão leucocitária (Eades, 2010a; Eades, 2010b). Há a hipótese de que inflamação sistêmica precede o início da claudicação em modelos experimentais, incitando danos lamelares (Belknap et al., 2009; Belknap, 2010; Katz & Bailey, 2012). Em modelos de laminite induzida por excesso de carboidratos, a febre e a taquicardia ocorreram antes da claudicação, o que pode comprovar esse fato (Eades, 2010b; Leise et al., 2011; Lima et al., 2013).

Ainda, um estudo retrospectivo mostrou que os equinos com sinais clínicos compatíveis com inflamação sistêmica possuíam cinco vezes mais chances de desenvolverem a laminite (Eades, 2010b). Em outro estudo foram observadas alterações no tecido lamelar de equinos em quadro de obstrução intestinal, possivelmente devido à ativação inflamatória sistêmica ocasionada pela lesão de isquemia/reperfusão que ocorrem nos distúrbios gastrointestinais (Rio Tinto et al., 2004).

Durante o início da sepse bacteriana, os componentes de bactérias gram-positivas (ácido lipoteicóico e peptidoglicano) e gram-negativas (lipopolissacarídeo [LPS]), designados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), são reconhecidos pelo sistema imune inato por receptores tais como os “toll like receptors” (TLRs) após sofrer agressão por patógenos infecciosos (Adib-Conquy & Cavaillon, 2007). Os PAMPs estimulam células inflamatórias, endoteliais e plaquetárias, incitando a resposta inflamatória local. Entretanto, ao atingirem a circulação sistêmica, os PAMPs podem estimular respostas por diversas vias e diferentes células do hospedeiro de uma única vez, iniciando assim uma condição de reações exacerbadas (síndrome da resposta inflamatória sistêmica) que, se não tratada, promove a falência múltipla de órgãos (Belknap, 2010a).

Assim que os leucócitos ligam-se aos PAMPs circulantes, liberam citocinas na corrente sanguínea. Entre esses mediadores inflamatórios, os mais comuns são o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas (IL) 1, IL6 e IL8 (Belknap et al., 2009; Belknap, 2010a; Katz & Bailey, 2012). A presença de PAMPs e citocinas inflamatórias circulantes estimula o endotélio vascular a expressar moléculas de adesão e quimiocinas no endotélio vascular de órgãos alvo. Esses eventos endoteliais, combinados com a estimulação de leucócitos circulantes, acarretam na adesão leucocitária e subsequente migração para os tecidos distantes do órgão alvo, onde eles causam lesão tecidual, disfunção e morte celular devido à produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e proteases. Atualmente, alguns pesquisadores acreditam que esse evento acontece nas lamelas digitais, dando início aos danos teciduais locais que caracterizaria a laminite (Belknap et al., 2009; Lunn & Hurley 2009; Belknap, 2010a; Faleiros et al., 2011; Lima et al., 2013, Faleiros & Belknap, 2017).

3.5 Diagnóstico

Os equinos com suspeita de laminite devem ser avaliados clinicamente de forma criteriosa, com inspeção cuidadosa e o monitoramento constante. Todos os sinais clínicos descritos anteriormente, principalmente durante a fase aguda da laminite, devem ser considerados e podem ser relacionados a esta afecção. Entretanto, o uso de métodos diagnósticos complementares faz-se necessário principalmente na fase crônica da laminite.

3.5.1 Radiologia

Enquanto a laminite aguda é diagnosticada principalmente com base nos sinais clínicos, a laminite crônica pode ser diagnosticada muito bem por meio de imagens radiográficas. Radiografias de todos os estojos córneos devem ser realizados mesmo em casos de laminite aguda, a fim de se ter uma referência para exames subsequentes, e estes devem ser repetidos a cada 3 a 4 dias no período inicial (van Eps, 2010). As radiografias não apenas ajudam a fazer um diagnóstico, mas também são úteis na determinação da evolução da condição ou dos resultados do tratamento. A projeção radiográfica lateromedial provavelmente tenha maior valor diagnóstico. No entanto, é sempre aconselhável fazer as projeções radiográficas dorsopalmar/dorsoplantar e oblíqua dorsopalmar/plantar, para diagnosticar a rotação mediolateral e verificar a integridade da extremidade da falange distal.

3.5.2 Venografia digital

A venografia (angiografia venosa retrógrada) revela déficits na vasculatura do estojo córneo equino em um animal em estação. O fato de as veias digitais equinas serem sem valvas permite o preenchimento retrógrado quase completo com material de contraste radiopaco (Pollitt, 2008). O equino deve ser sedado e o bloqueio do nervo sesamóide abaxial deve ser realizado no membro selecionado para dilatar os vasos. Uma bandagem elástica deve ser firmemente enrolada ao redor do boleto em uma direção próximo-distal para dilatar ainda mais as veias digitais, eliminar a influência da pressão sanguínea e reduzir o fluxo sanguíneo venoso. Posteriormente, um scalp é utilizado para punção da veia digital lateral/medial palmar/plantar. Na maioria dos equinos, cerca de 20-25 ml de material de contraste radiopaco pode ser injetado. Radiografias digitais devem ser feitas imediatamente após a injeção para evitar a difusão do material de contraste da vasculatura digital para os tecidos adjacentes. O equino não deve carregar todo o seu peso sobre o membro investigado, pois o plexo dorsal sublamelar não pode se encher de sangue sob essa pressão (Pollitt, 2008; Baldwin & Pollitt, 2010).

Entretanto, mesmo com o domínio da técnica de venografia digital, faz-se importante o conhecimento sobre a anatomia vascular devido a áreas do estojo córneo que são irrigadas por diferentes vasos sanguíneos. As artérias do estojo córneo formam anastomoses e estas não irrigam apenas uma área e terminam. Se uma área vascular é comprometida, o tecido afetado também vai ficar comprometido, entretanto, não se torna necessariamente isquêmico. Por exemplo, o plexo coronário (irrigado pelo ramo dorsal da artéria coronária da falange média), arco terminal e vasos circunflexos irrigam a lâmina dorsal. Uma lesão ou compressão de qualquer destas áreas vai reduzir, mas pode não interromper perfusão lamelar. A região dos talões é raramente afetada nos casos moderados devido aos vários ramos de vasos sanguíneos que a irrigam. Se todos os vasos no interior do casco estiverem comprometidos,

a artéria bulbar, que tem origem na falange proximal e média, pode continuar a irrigar a derme coronária palmar, rasilha, derme cutânea e derme lamelar dos talões (Rucker, 2007).

Existem seis áreas que são avaliadas na imagem de venografia digital, o AT, a vasculatura dos talões (VT), o plexo coronário (PC), os vasos dorsais sublamelares (VSL), vasos circunflexos (VC) e a junção circunflexa-lamelar (JCL) (Figura 1).

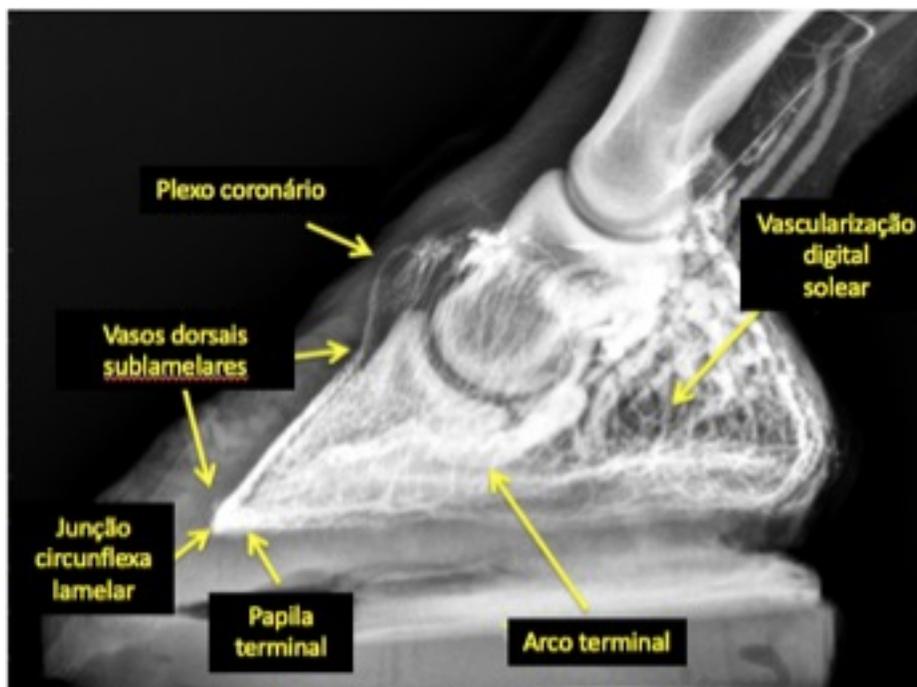


Figura 1: Venografia digital de equino saudável. Principais locais de avaliação da vasculatura digital. Fonte: Leise 2016 (comunicação pessoal).

3.5.2.1 Arco terminal

O arco terminal (AT) tem origem nos vasos digitais palmares e está localizado no interior do centro da falange distal. As artérias digitais palmares são preenchidas retrogradamente pelo contraste e são evidentes na quartela devido à sua parede muscular. Os ramos do AT passam através de forâmes até à superfície parietal da falange distal, onde anastomosam-se com os vasos sublamelares (VSL). A aparência do AT está raramente alterada, mesmo em casos severos de laminite. Contudo, o contraste pode estar reduzido ou ausente em alguns casos de deslocamento distal, enfarte e espessamento da parte distal do tendão flexor digital profundo. Qualquer redução no AT também desencadeia uma diminuição de suprimento sanguíneo na

derme lamelar. Se o AT permanecer comprometido, então o prognóstico de sobrevivência superior a 6 meses é reservado. Os vasos sanguíneos do AT são cruciais para a saúde da falange distal e da derme lamelar (Rucker, 2017).

3.5.2.2 Plexo coronário

Os vasos do plexo coronário (PC) tem origem ao nível da falange média, proximal à cápsula do estojo córneo. Na vista lateral, o PC é proximal e dorsal ao processo extensor. Cada papila coronária dérmica é constituída por uma veia e artéria, e projetam-se para depressões cônicas no sulco coronário. Quando visíveis, as papilas coronárias normais são paralelas à face dorsal da falange distal. A porção posterior mais direita do PC reflete a forma dorsodistal da falange média e do processo extensor da falange distal (Denoix, 2000). Na vista dorsopalmar o PC medial e lateral podem ser assimétricos devido à diferença de peso, forma e carga interna da banda coronária medial e lateral. Quando a laminite ocorre as papilas coronárias tornam-se distorcidas e podem desaparecer. O contraste pode estar reduzido na porção distal do PC e na região onde formam as anastomoses com os vasos sublamelares proximodorsal. Com o deslocamento da falange, o PC torna-se verticalmente alongado e estreito devido à compressão entre a falange distal e ao estojo córneo proximal. Quando a laminite crônica distorce permanentemente o PC, as papilas coronárias deixam de estar orientadas com a face da falange distal e a parede dorsal do estojo córneo não cresce mais paralela à face dorsal da falange distal (Rucker, 2017).

3.5.2.3 Vasos sublamelares

Os vasos sublamelares (VSL) localizam-se entre a junção dérmica/epidérmica e a falange distal. Em um estojo córneo normal, os vasos sublamelares são evidentes como uma linha uniforme distinta a 4 milímetros da superfície parietal da falange distal. Os vasos sublamelares unem-se proximalmente com o PC, centralmente participam na irrigação com AT e distalmente juntam-se com os vasos circunflexos (VC). Devido à separação entre a lâmina dérmica e epidérmica, os vasos sublamelares podem tornar-se mais largos e distorcidos, e os vasos de menor diâmetro ficam mais evidentes no venograma. Se ocorrer uma separação uniforme, como no deslocamento distal simétrico, os vasos sublamelares aparecem com uma forma retangular de contraste uniforme nas vistas lateromedial e dorsopalmar. No entanto, quando ocorre um deslocamento rotacional, os vasos sublamelares podem aparecer com uma forma triangular. Alternativamente, independente do tipo de deslocamento, os vasos sublamelares podem estar comprimidos e o contraste estar completamente ausente. A compressão dos VSL, pode resultar de uma das seguintes situações, deslocamento da falange distal comprometendo a derme entre o osso e a muralha

do casco, lesão dos vasos secundariamente ao deslocamento da falange e edema sublamelar (Rucker, 2017).

3.5.2.4 Vasos circunflexos

Os VC encontram-se distais e periféricos à margem palmar da falange distal. Não existem ramos vasculares provenientes do AT que penetrem a falange, apenas os ramos dos VC são responsáveis pela irrigação distal à falange da derme solear e papilas solares. Esta área é particularmente vulnerável à compressão resultante do deslocamento da falange distal. Tanto as papilas soleares como as terminais são paralelas à face dorsal da falange distal. Equinos saudáveis têm uma grande variação na aparência dos VC e sola, dependendo da profundidade da sola e remodelação óssea da borda distal da falange distal. Na vista dorsopalmar de um equino com laminite, o contraste dos VC na linha média está normalmente reduzido ou ausente. O padrão do contraste por vezes é assimétrico devido às diferenças internas na carga dentro do estojo córneo. No início da laminite no venograma lateromedial, as papilas soleares tornam-se inicialmente desorientadas, deixam de estar paralelas à superfície dorsal da falange distal e depois ausentes distalmente à mesma. Se a laminite evolui, o contraste nos VC e sola iniciam-se reduzido e depois ausente distal à extremidade da falange distal. A compressão dos VC pode se estender desde a extremidade da falange distal até o ápice das cartilagens alares (Rucker, 2017).

3.5.2.5 Vascularização dos talões

A vascularização dos talões (VT) tem origem na região da quartela e irriga os bulbos, ranilha, lâmina dos talões caudal e plexo coronário (Rucker, 2017). O padrão de contraste nos talões raramente está reduzido (Bowker, 2003a; Bowker, 2003b; Rucker & Orsini, 2014; Baldwin & Pollitt, 2010), exceto em possíveis casos severos de deslocamento simétrico da falange distal (Rucker, 2017).

3.5.2.6 Junção circunflexa-lamelar

A JCL tem particular interesse na venografia digital, uma vez que forma um ângulo de 50°, composto pelas superfícies dorsal e palmar da falange distal, extremidade dorsodistal da falange distal e origina as papilas terminais que formam a linha branca. As papilas terminais perdem a sua orientação assim que a JCL começa a ter uma forma dobrada (Rucker, 2010; Rucker, 2017).

Em casos mais graves de laminite, a JCL desloca-se proximalmente à extremidade da falange distal, e esta alteração pode ocorrer antes de existir deslocamento da falange distal

mensurável nas radiografias. As papilas terminais tornam-se orientadas quase perpendiculares à superfície dorsal da falange distal. Se o tratamento não obtiver sucesso, as papilas irão continuar a produzir epiderme, mas em uma orientação incorreta. Conseqüentemente, o crescimento do estojo córneo estará comprometido, contribuindo para a compressão da derme e distal dorsal à extremidade da falange distal (Rucker, 2017).

3.6 Tratamento

Existem várias estratégias terapêuticas disponíveis para o tratamento da laminite. As principais medidas serão apresentadas, destacando as informações baseadas em resultados de pesquisa científica.

3.6.1. Terapia medicamentosa

3.6.1.1 Terapia anti-inflamatória

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), mais comumente a flunixin meglumine na dose de 1,1 mg / kg ou fenilbutazona na dose de 2,2-4,4 mg/kg por via intravenosa ou oral duas vezes ao dia, têm efeito anti-inflamatório e analgésico (Rendle, 2006). Doses mais baixas de apenas 0,5 mg/kg de flunixin meglumine também podem ser eficazes (van Eps, 2010). Adicionalmente, doses baixas de flunixin meglumine (0,25 mg/kg) a cada 8 horas podem ser utilizadas com a finalidade de interromper a produção de eicosanoides associados à endotoxemia e alivia parcialmente seus sinais clínicos (Semrad et al., 1987). No entanto, essa dosagem baixa não fornece analgesia. Em geral, os AINEs são usados para prevenir a inflamação da interface lamelar, bem como outras doenças inflamatórias subjacentes. Como essas drogas não são inibidores seletivos das ciclooxigenases (COX), seu efeito sobre as COX-1 pode ter efeitos deletérios sobre a integridade da mucosa gástrica e a função e perfusão dos rins, respectivamente (Rendle, 2006).

O firocoxib está disponível para uso em equinos, porém muitas vezes não fornece analgesia suficiente para casos de laminite. Além disso, a inibição da COX-1 pode fornecer maior eficácia do que a inibição da COX-2, reduzindo a liberação ativada por plaquetas de produtos inflamatórios e vasoativos. O firocoxib é um anti-inflamatório com maior seletividade de inibição COX-2 e pode ser utilizado na dosagem de 0,1 mg/kg por via oral a cada 24 horas (Belknap, 2010b).

3.6.1.2 Terapia antioxidante

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um eliminador de radicais livres de oxigênio. Espécies reativas de oxigênio são produzidas como resultado da lesão de reperfusão após um período de isquemia e acredita-se que desencadeiam secreção de MMP, bem como sua ativação (Clutterbuck et al., 2010). Além disso, o DMSO inibe a agregação plaquetária (Rendle, 2006). O DMSO é comumente administrado como uma infusão intravenosa na dose de 0,1-1 g / kg em solução a 10% (Rendle, 2006). A concentração deve permanecer abaixo de 20% para evitar a hemólise intravascular (Pollitt, 2008).

3.6.1.3 Vasodilatadores e anticoagulantes

A acepromazina é, frequentemente, usada para induzir a vasodilatação digital e, assim, contrabalançar a possível hipoperfusão ou isquemia lamelar digital durante a fase de desenvolvimento e aguda. No entanto, um suprimento sanguíneo digital aumentado após sua aplicação não foi provado até o momento. Também promove efeito sedativo, ocasionando relutância no movimento e estimulando o decúbito em equinos, conseqüentemente, reduz a dor e os danos mecânicos às lamelas. Também reduz a hipertensão sistêmica, que é provavelmente um resultado de dor digital grave. É recomendada a administração de 0,06 mg/kg por via intravenosa ou 0,1-0,2 mg/kg por via oral 2 a 3 vezes ao dia (Rendle, 2006). Em outro estudo é recomendado a administração de 0,02-0,04 mg/kg por via intramuscular ou intravenosa 4 vezes ao dia (van Eps, 2010).

A isoxsuprina tem ação agonista β -adrenérgico e propriedades antagonistas α -drenérgicas. Acredita-se que ela aumente o fluxo sanguíneo digital mediado pela vasodilatação e que tenha algumas propriedades reológicas (Parks, 2003).

A pentoxifilina, um derivado da metilxantina, tem efeitos reológicos e anti-inflamatórios e causa a inibição do TNF- α (van Eps, 2010). A pentoxifilina melhora a deformabilidade da membrana das células sanguíneas e, diminui a viscosidade do sangue (Belknap, 2001). Acredita-se que esta característica aumenta o fluxo sanguíneo e inibe a agregação plaquetária nas extremidades e lamelas digitais, respectivamente, e é geralmente administrada na dose de 7,5-8,5 mg / kg por via intravenosa (Rendle, 2006; Orsini, 2011). No entanto, pesquisas mostraram que, ao contrário do esperado, a pentoxifilina apressa a agregação plaquetária induzida pelo colágeno no sangue total equino e, conseqüentemente, poderia causar a deterioração da isquemia lamelar (Kornreich et al., 2010).

A heparina, com seu efeito anticoagulante, pode ser capaz de prevenir a laminite se administrada durante a fase prodrômica, mas sua eficácia na fase aguda ou crônica, é duvidosa (Parks, 2003; Orsini, 2011). Durante a fase de desenvolvimento, ela poderia inibir a formação de microtrombos, que foram detectados em tecidos lamelares de equinos com laminite aguda (Weiss et al., 1994). Como a laminite geralmente não é detectada durante essa fase inicial, a heparina é frequentemente administrada muito tarde, apresentando menor efeito terapêutico. No entanto, 100-150 UI / kg podem ser administrados por via subcutânea duas vezes por dia (Rendle, 2006). Sua utilização necessita cautela, uma vez que a heparina pode

causar a auto-aglutinação dos eritrócitos e prejudicar ainda mais o suprimento de sangue lamelar. Este efeito prejudicial não foi detectado em combinação com a heparina de baixo peso molecular, sendo, portanto, recomendado no caso da laminite equina (Belknap, 2001). Além do efeito antitrombótico da heparina, sugere-se que a substância contenha efeitos anti-inflamatórios.

O trinitrato de gliceril aplicado como uma pomada na pele acima dos vasos digitais e na banda coronária pode ser convertido em óxido nítrico nas paredes dos vasos sanguíneos, desencadeando vasodilatação. No entanto, este efeito não foi cientificamente comprovado (Rendle, 2006). Além disso, a tolerância a essa droga pode ocorrer rapidamente em equinos (Belknap, 2001).

3.6.1.4 Controle da dor

Os AINEs são os analgésicos mais usados em equinos com laminite. Sua ação já foi comentada anteriormente. Contudo, medicamentos adicionais têm sido procurados quando o tratamento da dor fornecido apenas pelos AINEs é inadequado. A lidocaína, administrada em bolus intravenoso de 1,3 mg/kg, seguida por uma infusão contínua intravenosa de 3 mg/kg/hora, tem sido usada extensivamente em equinos hospitalizados submetidos à celiotomia exploratória para controlar a dor e o íleo no período pós-operatório (Malone et al., 2006). Porém, a lidocaína tem sido usada menos extensivamente para suplementar a analgesia fornecida pelos AINEs em casos de laminite, portanto, a eficácia é desconhecida, sendo muitas vezes substituída por morfina nos casos em que os AINEs não fornecem analgesia suficiente (Rendle, 2006; van Eps, 2010). A morfina, na dose de 0,1 mg/kg, pode ser administrada por via intramuscular e repetidas a cada 4 horas nos casos que não respondem aos AINEs (Rendle, 2006). O butorfanol também pode ser administrado por via intravenosa (0,01 a 0,05 mg/kg três a seis vezes ao dia) ou intramuscular (0,04 a 0,1mg/kg três a seis vezes ao dia) para suplementar a analgesia fornecida pelos AINEs e/ou lidocaína.

Para animais com dor extrema, outra alternativa terapêutica viável é a terapia multimodal. Mais comumente, nestas situações a combinação de infusão contínua de lidocaína (1,3 mg / kg em bolus seguida de 3 mg/kg /hora), cetamina (0,4 a 1,2 mg/kg/hora) e butorfanol (18 µg/kg de peso corporal e 10 a 23 µg/kg de peso corporal / hora) têm sido utilizados (Driessen & Zarucco, 2017).

Os adesivos de fentanil podem ser anexados à pele se a dor digital for mais grave e não puder ser tratada com AINEs. Um ou dois adesivos, 10mg cada, podem ser usados e seu efeito geralmente dura até 2 dias. Porém, seus resultados são variáveis e podem causar excitação em alguns casos, necessitando mais estudos (Thomasy et al., 2004).

Outra droga utilizada é gabapentina. Ela tem sido amplamente utilizada na medicina humana para tratar a dor neuropática, quadro algico esse que tem sido suspeitado em casos de laminite crônica. As propriedades farmacocinéticas foram avaliadas em equinos com a dose de 20

mg/kg por via oral e por via intravenosa, demonstrando que a medicação é segura, causa sedação leve e tem baixa biodisponibilidade oral. Tem sido difícil avaliar se a gabapentina proporciona benefícios aos pacientes com laminite, sugerindo a necessidade de avaliação adicional (Terry et al., 2010).

3.6.1.5 Modulação de sensibilidade à insulina

A metformina tem sido usada com sucesso para aumentar a sensibilidade à insulina em equinos e pôneis em uma dose oral de 15 mg/kg (van Eps, 2010). Aumentando a sensibilidade à insulina, esta droga poderia ajudar a baixar os níveis de insulina no sangue. Acredita-se que a insulina desencadeie a laminite tanto por alterações vasculares quanto pela ativação das matrizes de metaloproteinases.

3.6.1.6 Manejo corretivo do estojo córneo

Diversas práticas sobre o manejo corretivo do casco de animais com laminite crônica foram publicadas. Dentre estas, os principais tratamentos são a aplicação de órteses e ferraduras ou aparelhos similares, e existem técnicas de eficácia questionáveis, especialmente por resposta individual e diferentes graus de envolvimento do casco (Parks & O'grady, 2003; Morrison, 2010). A utilização destes materiais objetiva a estabilização falangeana, promover conforto e redução da dor, e estimular o crescimento de novo extrato córneo. O realinhamento da falange distal e da sola deve ser realizado removendo-se progressivamente o talão e a parede do estojo córneo. A aplicação de ferraduras tradicionais em forma de coração, ovais e invertidas tem sido indicada. Entretanto, materiais e adesivos alternativos têm sido cada vez mais utilizados, como a fixação de um tamanco de madeira com o único intuito de recrutar apoio da rasilha e talão, e reduzir o contato da superfície com o solo, melhorando o "breakover", reduzindo a força à qual o estojo córneo deixa o solo (Stewart, 2010). Existem estratégias para minimizar o descolamento mecânico, como a aplicação de substâncias fixadoras na sola do casco, como resina acrílica em associação com ferraduras, e são úteis no controle da progressão da doença (Morrison, 2010). Em alguns casos, a tenotomia é recomendada, afim de remover a tensão exercida pelo tendão sobre a falange distal (Hunt et al., 1990). Também alguns casos mais específicos em que se observa crescimento irregular da parede devido à necrose e comprometimento da banda coronária, a retirada da parede permite o crescimento do tecido em realinhamento à falange distal (Rucker, 2010).

3.6.1.7 Terapia regenerativa – Células tronco mesenquimais

A terapia com células-tronco vem sendo utilizada por alguns médicos veterinários para o tratamento da laminite. É importante reconhecer que não foram realizados estudos para avaliar a segurança ou a eficácia das células-tronco para o tratamento desta condição devastadora. Enquanto um estudo recente de Carter et al. (2011) demonstraram que os equinos com laminite têm uma perda de células-tronco epidérmicas p63-positivas em comparação com equinos hígidos controle, e não se sabe se a administração de células tronco mesenquimais (CTMs) poderia auxiliar no repovoamento de células-tronco epidérmicas. Também é desconhecido se a administração de células-tronco epidérmicas colhidas em outras regiões dos equinos, como a pele, poderia ser eficaz para o tratamento da laminite (Carter et al., 2011). As células-tronco são administradas uma vez, no início do episódio agudo, e novamente 14 dias depois. Como atualmente não há dados publicados para avaliar a eficácia das células-tronco para laminite, técnicas adequadas de administração, tipos de células e números de células ainda não foram avaliadas.

4. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA MEDICINA VETERINÁRIA EQUINA

O uso de células-tronco na medicina veterinária equina vem crescendo em um ritmo mais rápido que as evidências científicas e clínicas disponíveis na literatura (Frisbie & Smith, 2010, Clegg & Pinchbeck, 2011, Fortier & Travis, 2011; Stewart, 2011). Em geral, as pesquisas precedem o uso clínico, e o desenvolvimento da terapia se espelha e acompanha os avanços da medicina humana. Porém a pesquisa e uso clínico das CTMs adultas derivadas de adultos seguiu um caminho completamente diferente. Sua utilização em afecções ortopédicas ocorreu em 2003, mediante poucas publicações de investigação. A partir disso houve uma explosão no uso das CTMs em milhares de cavalos pelo mundo todo (Borjesson & Peroni, 2011).

Apesar do uso generalizado de células tronco para o tratamento de distúrbios musculoesqueléticos em equinos, poucos são os dados que fornecem dados clínicos de longo prazo referentes à sua aplicação terapêutica. Muitos estudos clínicos e experimentais que são realizados necessitam de grupos de controle adequados e muitas vezes os resultados são complicados devidos abordagens terapêuticas multimodais. Existem evidências para suportar a utilização de CTMs adultas cultivadas e processadas no tratamento de distúrbios musculoesqueléticos equinos, incluindo tendinites, desmites, osteoartrites e laminite (Schnabel et al., 2013).

As duas fontes de células tronco mais comumente utilizadas na medicina veterinária equina são as CTMs derivadas da medula óssea e do tecido adiposo (Frisbie & Smith, 2010; Fortier & Travis, 2011; Gutierrez-Nibeyro, 2011). Estas fontes celulares podem ser usadas terapêuticamente após um período de cultura ou após um breve processo de centrifugação (separação de células mononucleares) (Schnabel et al., 2013).

O tecido adiposo é geralmente colhido na região pericoccígea, depois digerido com colagenase e colocado em cultura durante várias semanas para obter CTMs derivadas de tecido adiposo (adCTM) ou processadas comercialmente a fim de isolar a fração vascular estromal de células derivadas de tecido adiposo (FVE-AD) no período de 4-24 horas (Gutierrez-Nibeyro, 2011).

Embora as adCTM equinas sejam bem descritas na literatura (Vidal et al., 2007; Vidal et al., 2011; de Mattos Carvalho et al., 2009; Pascucci et al., 2011; Raabe et al., 2011) as células da FVE-AD foram favorecidas em detrimento de adCTM no uso clínico, fato provável devido à sua disponibilidade comercial e curto tempo desde a colheita tecido adiposo até sua aplicação clínica (Gutierrez-Nibeyro, 2011). É importante notar, no entanto, que por causa da falta da etapa de cultura, apenas uma fração (20-40%) das células da FVE-AD podem ser consideradas células estaminais (Vidal et al., 2007).

4.1 Aplicabilidade das células tronco mesenquimais na laminite em equinos

O valor terapêutico das CTMs adultas pode ser baseado não apenas na sua contribuição para o reestabelecimento da arquitetura dos tecidos danificados, mas também na sua capacidade comprovada em modular a resposta inflamatória. As CTMs apresentam efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladoras potentes, através de interações célula-célula e ou liberação de fatores solúveis no ambiente local. Ainda possuem um perfil ou imunofenotipagem distinta de fatores bioativos tróficos, mediadores inflamatórios e moléculas de adesão que atuam inibindo a formação da cicatrização e apoptose, aumentam angiogênese e estimulam células progenitoras intrínsecas para levar ao retorno da homeostase do tecido (Caplan, 2009).

Há uma grande esperança pelos profissionais da área equestre de que as CTMs possam ser eficazes no tratamento da laminite. Muitos médicos veterinários estão atualmente administrando células-tronco de diferentes fontes em equinos com laminite. É importante reconhecer que não foram realizados estudos para avaliar a segurança ou eficácia das células estaminais para o tratamento desta condição. Acredita-se que devido às características que as CTMs possuem e foram descritas anteriormente, possam ser utilizadas como potencial terapêutico nestes animais (Morrison et al., 2014).

Enquanto um estudo demonstrado por Carter et al. (2011) em que equinos com laminite demonstraram perda significativa de células estaminais epidérmicas p63-positivas em comparação com ao grupo controle (cavalos hípidos), desconhece-se se a administração das CTMs pode ajudar no repovoamento das células estaminais epidérmicas. Também é desconhecido se a administração de células estaminais epidérmicas colhidas a partir de outras regiões do equino, tal como a pele, poderia potencialmente ser eficazes para o tratamento de laminite (Carter et al., 2011).

A perfusão regional de membros por meio de infusão de células tronco é atualmente utilizada clinicamente para o tratamento de laminite, usando a veia digital lateral abaxial ao osso sesamóide proximal (local de aplicação). Os proprietários procuram a terapia com células-tronco como uma cura para o seu cavalo, uma vez que eles sabem as consequências devastadoras desta afecção (Morrison et al., 2014). No entanto, embora esta abordagem possa ser útil, a causa subjacente da doença deve ser perseguida com diagnóstico em conjunto com a gestão médica e terapias nutricionais. Idealmente, os cavalos com laminite devem ser tratados na fase aguda na tentativa de diminuir a resposta inflamatória, mas isso requer o uso de células autólogas ou aplicação de células alogênicas (Schnabel et al., 2013).

As células-tronco são comumente referidas como imune-privilegiadas, uma vez que não estimulam uma resposta imune. No entanto, em um estudo realizado sugere que a maioria (90%) das CTMs de medula óssea de cultura precoce expressam o marcador MHC II (complexo principal de histocompatibilidade classe II), indicando que eles são totalmente capazes de incitar uma resposta imune em um receptor (Schnabel et al., 2013). Porém, as CTMs adultas expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classe I, mas não da classe II (Tyndal et al., 2007). Isso contribui para a não rejeição das células indiferenciadas (Wan et al., 2008).

Para o tratamento da laminite, a maioria dos cavalos são tratados com células estaminais duas vezes, sendo uma vez o mais cedo possível durante um episódio agudo e novamente aos 14 dias após a primeira aplicação. Como não existem dados publicados para avaliar a eficácia das células estaminais para a laminite, as técnicas de administração, os tipos de células e o número de células ainda não foram avaliados e validados, somente apenas sugeridos por atuações clínicas (Schnabel et al., 2013; Morrison et al., 2014).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nas informações apresentadas nesta revisão, fica evidenciado que a classificação sobre as fisiopatogênias da laminite estão bem esclarecidas, e cada vez mais há progresso sobre o tratamento para esta grave condição que afeta os equinos. Estes avanços só ocorreram mediante aos modelos experimentais desenvolvidos e todas as pesquisas realizadas baseadas no entendimento biomolecular da doença. Ainda, pesquisas sobre possíveis fármacos que possam atuar no bloqueio ou inibição da laminite, e, o uso da terapia regenerativa na melhora da condição de animais portadores da doença encontram-se em franca ascensão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIB-CONQUY M, CAVAILLON JM. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. FEBS letters, v. 581, p. 3723-3733, 2007.

- BALDWIN GI, POLLITT CC. Progression of venographic changes after experimentally induced laminitis. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v.26, n.1, p.135-140, 2010.
- BAILEY SR, MARR CM, ELLIOTT J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *The Vet. J.*, v. 167, p. 129-142, 2004.
- BAXTER GM. Acute Laminitis. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, p. 627 – 642, 1994.
- BELKNAP JK. Laminitis: An Overview. In: J. K. Belknap, *Equine Laminitis*. Iowa: Wiley Blackwell. p. 11-12, 2017.
- BELKNAP JK, FALEIROS RR, BLACK SJ, JOHNSON PJ, EADES S. The laminar leukocyte: from sepsis to endocrinopathy models of laminitis. *J. Eq. Vet. Sci.*, v.31, p.562-609, 2011.
- BELKNAP JK. Black walnut extract: an inflammatory model. *Vet. Clin. Eq.*, v. 26, p. 95 - 101, 2010 (a).
- BELKNAP JK. The pharmacologic basis for the treatment of developmental and acute laminitis. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v. 26, p. 115–124, 2010 (b).
- BELKNAP JK, MOORE JN, CROUSER EC. Sepsis - from human organ failure to laminar failure. *Vet. Immunol. Immunopath.*, v.129, n. 155 – 157, 2009.
- BELKNAP JK, GIGUÈRE S, PETTIGREW A, COCHRAN AM, VAN EPS A W, POLLITT CC. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. *Eq. Vet. J.*, v.39, p.42-7, 2007.
- BELKNAP J.K. Medical treatment options in equine laminitis. In: Morris, D.D. (ed.): *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. v. 10, p. 918-921, 2001.
- BORJESSON DL, PERONI JF. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clin. in Lab. Med.*, V. 31, p. 109-123, 2011.
- BOWKER R. Contrasting Structural Morphologies of “Good” and “Bad” footed horses. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners, Louisiana*. p. 186-209, 2003 (a).
- BOWKER R. The Growth and Adaptive Capabilities of the Hoof Wall and Sole: Functional. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners, Louisiana*. p. 146-168, 2003 (b).
- CAPLAN AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The J. of Path.*, V. 217, p. 318-324, 2009.
- CARTER RA, ENGILES JB, MEGEE SO, SENOO M, GALANTINO-HOMER HL. Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. *Eq. Vet. J.*, p. 543 – 551, 2011.

- CLEGG PD, PINCHBECK GL. Evidence-based medicine and stem cell therapy: how do we know such technologies are safe and efficacious? *Vet. Clin. North Am. Eq. Pract.*, v. 27, p. 373-382, 2011.
- CLUTTERBUCK AL, HARRIS P, ALLAWAY D, MOBASHERI A. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *Vet. J.* v. 1, p. 27-38, 2010.
- COLLINS SN, VAN EPS AW, POLLITT CC, KUWANO A. The Lamellar wedge. *Vet. Clin. of N. Am. Eq. Pract.*, v. 26, p. 179–195, 2010.
- D'ARPE L, BENARDINI D. Digital Venography in Horses and Its Clinical Application in Europe. *The Veterinary clinics of North America. Eq. Pract.*, p. 339-359, 2010.
- DE LAAT, M, PATTERSON-KANE J, POLLITT CC, SILLENCE M, MCGOWAN C. Histological and morphometric lesions in the pre-clinical, developmental phase of insulin-induced laminitis in Standardbred horse. *Vet. J.*, p. 305-312, 2013.
- DE LAAT MA, MCGREE JM, SILLENCE, MN. Equine hyperinsulinemia: investigation of the enteroinsular axis during insulin dysregulation. *Am. J. Phys. Endocrin. Met.*, v. 310, p. 61-72, 2015.
- DE LAAT MA, POLLITT CC, WALSH DM, MCGOWAN CM, SILLENCE MN. Persistent digital hyperthermia over a 48h period does not induce laminitis in horses. *Vet. J.* v. 192, p. 435-440, 2012.
- DE LAAT MA, MCGOWAN CM, SILLENCE MN, POLLITT CC. Equine laminitis: comparative histopathology 48 hours after experimental induction with insulin or alimentary oligofructose in Standardbred horses. *J. Eq. Vet.*, v. 42, p. 129-135, 2010.
- DE MATTOS CARVALHO A, ALVES ALG, DE OLIVEIRA PGG, ÁLVAREZ LEC. et al. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J. Eq. Vet. Sci.*, V. 31, p. 26-34, 2011.
- DERN K, VAN EPS A, WITTUM, T, WATTS M, POLLITT C, BELKNAP, J. Effect of Continuous Digital Hypothermia on Lamellar Inflammatory Signaling When Applied at a Clinically-Relevant Timepoint in the Oligofructose Laminitis Model. *J. Vet. Int. Med.* v. 32, 450-458, 2018.
- DRIESSEN B, ZARUCCO L. Analgesia. In: *Equine Laminitis*, p. 291-305, 2017.
- EADES SC. Overview of current laminitis research. *Vet Clin Equine* v. 26, p. 51-63, 2010 (a).
- EADES SC. Overview of what we know about the pathophysiology of laminitis. *Journ. Equine Vet. Science.* v. 30, p. 83-86, 2010. (b).
- EUSTACE RA, EMERY SL. Case Report: Partial coronary epidermectomy (coronary peel), dorsodistal wall fenestration and deep digital flexor tenotomy to treat severe acute founder in a Connemara pony. *Eq. Vet. Ed.*, v. 2, p. 91-99, 2009.

- EUSTACE R, EMERY S, CRIPPS P. A retrospective study of 23 cases of coronary band separation longer than 8 cm as a sequel to severe laminitis. *J. Eq. Vet. Sci.*, p. 235-244, 2012.
- FALEIROS RR, BELKNAP, JK. Leukocytes and Inflammatory Signaling in Laminitis: Leukocytes. In: *Equine Laminitis*, p. 91-101, 2017.
- FALEIROS RR, JOHNSON PJ, NUOVO GJ, MESSER NT, BLACK SJ, BELKNAP JK. Laminar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *J. Vet. Int. Med.*, v. 25, p. 107-115, 2011.
- FALEIROS RR, LEISE BB, WESTERMAN T, YIN C, NUOVO GJ, BELKNAP JK. In vivo and in vitro evidence of the involvement of CXCL1, a keratinocyte-derived chemokine, in equine laminitis. *J. Vet. Int. Med.*, v. 23, p. 1086-1096, 2009.
- FORTIER LA, TRAVIS AJ. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res. Ther.*, v. 2, p. 1, 2011.
- FRANK N. Equine metabolic syndrome. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Prac.*, v. 1, p. 73-92, 2011.
- FRENCH KR, POLLITT CC. Equine laminitis: Glucose deprivation and MMP activation induce dermo-epidermal separation in vitro. *Eq. Vet. J.*, v. 3p. 261-266, 2004.
- FRISBIE DD, SMITH RKW. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Eq. Vet. J.*, v. 42, p. 86-89, 2010.
- GEOR RJ, FRANK N. Metabolic syndrome – From human organ disease to lamellar failure in equids. *Vet. Immunol. Immunop.*, v. 3 p. 151-154, 2009.
- GOETZ T. Anatomic, hoof, and shoeing considerations for the treatment of laminitis in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, p. 1323-1332, 1987.
- GUTIERREZ-NIBEYRO SD. Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Prac.*, v. 27, p. 363-371, 2011.
- HEYMERING HW. A historical perspective of laminitis. *The Vet. Clin. N. Am.*, v. 26, p. 1, 2010.
- HOOD DM. Laminitis in the horse. *The Vet. Clin. N. Am. Eq. Prac.*, p. 287-294, 1999.
- HUNT RJ, ALLEN D, BAXTER G M, JACKMAN BR, PARKS AH. Mid-metacarpal deep digital flexor tenotomy in the management of refractory laminitis in horses. *Vet. Surg.*, v.20, p.15-20, 1990.
- HUNTINGTON P, POLLITT CC, MCGOWAN CM. Recent research into laminitis. In: Pagan, J.D. (ed.): *Advances in equine nutrition IV*. Nottingham: Nottingham University Press. p. 293-312, 2009.
- JOHNSON PJ, SLIGHT SH, GANJAM VK, KREEGER JM. Glucocorticoids and laminitis in the horse. *The Vete. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v. 18, p. 219-236, 2002.

- KAINER R, FAILS D. Functional Anatomy of the Equine Musculoskeletal System. Em G. M. Baxter, Adams and Stashak's Lameness in Horses. Oxford: Wiley-Blackwell. p. 3-72, 2011.
- KARIKOSKI NP, MCGOWAN CM, SINGER ER, ASPLIN KE, TULAMO RM, PATTERSON-KANE JC. Pathology of natural cases of equine endocrinopathic laminitis associated with hyperinsulinemia. *Vet. Path.*, v. 52, p. 945-956, 2015.
- KARIKOSKI NP, PATTERSON-KANE JC, ASPLIN KE, MCGOWAN TW, MCNUTT M, SINGER ER, MCGOWAN CM. Morphological and cellular changes in secondary epidermal laminae of horses with insulin-induced laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 75, p. 161-168, 2014.
- KATZ, LM, BAILEY SR. A review of recent advances and current hypotheses on the pathogenesis of acute laminitis. *Eq. Vet. J.*, n. 44, p. 752-761, 2012.
- KÖNIG HE, LIEBICH HG. Common integument. In: *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas*, 6th edn, Schattauer, p. 615-666, 2014.
- KORNREICH B, ENYEART M, JESTY SA, NYDAM DV, DIVERS T. The effects of pentoxifylline on equine platelet aggregation. *J. Vet. Int. Med.*, v. 5, p. 1196-1202, 2010.
- KUWANO A, KATAYAMA Y, KASASHIMA Y, OKADA K, REILLY JD. A gross and histopathological study of an ectopic white line development in equine laminitis. *J. Vet. Med. Sci.*, n. 64, p.893, 2002.
- LASKOSKI LM, VALADÃO CAA, VASCONCELOS RDO, FERRUCCI D, SILVA JAF, MACHADO DRS, MENDONÇA FDS. Expression of matrix metalloproteases-2 and -9 in horse hoof laminae after intestinal obstruction, with or without hydrocortisone treatment. *Ciê. Rur.*, v.43, p.66-72, 2013.
- LASKOSKI LM, VALADÃO CAA, VASCONCELOS RO, FALEIROS RR, MENDES HMF, FERRUCCI D, SILVA JAF, MACHADO DDRS. Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) e calprotectina no tecido laminar de equinos após obstruçãojejunal, tratados ou não com hidrocortisona. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 32, n. 9, p. 817-823, 2012.
- LASKOSKI LM, VALADÃO CAA, VASCONCELOS RO, SOUZA AH, FALEIROS RR, AMORIM RL. Morphological abnormalities and apoptosis in lamellar tissue of equines after intestinal obstruction and treatment with hydrocortisone. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 62, p. 1331-1339, 2010.
- LASKOSKI LM, VALADÃO CAA, VASCONCELOS RO, PEREIRA RN, DIAS AD, ALESSI AC. Morphologic alterations of the hoof lamellar tissue, and clinic and laboratorial analyses of horses with lethal colic syndrome. *Pes. Vet. Bras.*, v. 29, p. 731-735, 2009.
- LEISE BS, FALEIROS RR, WATTS SM, JOHNSON PJ. et al. Lamellar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis. *Equine Vet. J.* v. 43, p. 54 – 61, 2011.

- LIMA LR, MENDES HMF, MAGALHÃES JF, MARKOWICZ LC. et al. Avaliação clínica e hematológica de equinos submetidos ao modelo de laminite por ligofructose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2. *Pesq. Vet. Bras.* v.33, p. 992-998, 2013.
- LOFTUS JP, BLACK SJ, PETTIGREW A, ABRAHAMSEN EJ, BELKNAP JK. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut-induced laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 68, p. 1205-1211, 2007.
- LUNN DP, HURLEY DJ. The role of leukocyte biology in laminitis. *Vet. Immunol. Immunopath.* v. 129, p. 158 - 160, 2009.
- MAGALHÃES JF, LIMA IR, LIMA LR, VARELA JARC, VIEIRA RAM, ALVES GES, FALEIROS, RR. Estudo de correlação de medidas radiográficas sinalizando laminite em éguas da raça Mangalarga Marchador com ou sem sinais de sobrepeso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 66, p. 1023-1032, 2014.
- MALONE E, ENSINK J, TURNER T, WILSON J, ANDREWS F, KEEGAN K, LUMSDEN J. Intravenous continuous infusion of lidocaine for treatment of equine ileus. *Vet. Surg.*, v. 35, p. 60-66, 2006.
- MORRISON S, DRYDEN VC, BRAS R, MORRELL S. How to use stem cells in clinical laminitis cases. In *Proceedings of the 60th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Salt Lake City, Utah, USA, p.499-503. American Association of Equine Practitioners (AAEP), 2014.
- MORRISON S. Chronic laminitis foot management. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v.26, p.425-446, 2010.
- NOSCHKA E, VANDENPLAS ML, HURLEY DJ, MOORE JN. Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 15, p.242-53, 2009 (a).
- NOSCHKA E, MOORE J, PERONI JF, LEWIS SJ, MORROW JD, ROBERTSON TP. Thromboxane and isoprostanes as inflammatory and vasoactive mediators in black walnut heartwood extract induced equine laminitis. *Vet. Immunol. Immuno.*, v.129, p. 200-210, 2009 (b).
- OBEL N. Studies on the histopathology of acute laminitis. *Studies on the histopathology of acute laminitis.* 1948.
- O'GRADY SE. Farriery for chronic laminitis. *Vet. Clin. N.Am.Eq. Prac.*, v. 2, p. 407-423, 2010.
- ORSINI JA. Laminitis: Prevention and early intervention in surgical and medical case management. *J. Eq. Vet. Sci.*, v. 10, p. 598-603, 2011.
- PARKS AH. Structural Dynamics of Displacement of the Distal Phalanx. In: J. K. Belknap, *Equine Laminitis Iowa: Wiley Blackwell.* p. 176 – 180, 2017.

- PARKS A, O'GRADY SE. Chronic laminitis: current treatment strategies. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v.19, p.393-416, 2003.
- PASCUCCI L, CURINA G, MERCATI F, MARINI C, DALL'AGLIO C, PATERNESI B, CECCARELLI P. Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: towards the definition of minimal stemness criteria. *Vet. Immunol. Immunopath.*, v. 144, p. 499-506, 2011.
- PAZ CFR, PAGANELA JC, DOS SANTOS CA, NOGUEIRA CEW, FALEIROS RR. Relação entre obesidade, insulina plasmática e posicionamento da falange distal em equinos da raça crioula. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 65, p. 1699-1705, 2013.
- PERONI JF, HARRISON WE, MOORE JN, GRAVES JE, LEWIS SJ, KRUNKOSKY TM, ROBERTSON, TP. Black walnut extract-induced laminitis in horses is associated with heterogeneous dysfunction of the laminar microvasculature., *Eq. Vet. J.*, v.37, p.546-551, 2005.
- POLLITT CC. Foot Structure and Function. Em C. C. Pollitt, *The Illustrated Horse's Foot* Missouri: Elsevier. p. 3-18, 2016.
- POLLITT CC, VISSER MB. Carbohydrate Alimentary Overload Laminitis. *Vet Clin. Eq.*, v.26, p. 65-78, 2010.
- POLLITT C. The anatomy and physiology of the suspensory apparatus of the distal phalanx. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Prac.*, p. 29-49, 2010 (b).
- POLLITT CC. Equine laminitis – Current concepts. Canberra (Australia): Rural Industries Research and Development Corporation. p. 116, 2008.
- POLLITT CC. Microscopic Anatomy and Physiology of the Hoof. Em A. E. Floyd, & R. A. Mansmann, *Equine Podiatry*. Missouri: Saunders. p. 90-101, 2007.
- POLLITT CC. Anatomy and Physiology of the Inner Hoof Wall. *Eq. Vet. J.*, v. 3, p. 3-21, 2004.
- POLLITT CC. Equine laminitis: a revised pathophysiology. *Am. Associ. Eq. Pract. Proc.*, v.45, p.188-192, 1999.
- POLLITT CC, DAVIES CT. Equine laminitis: its development coincides with increased sublamellar blood flow. *Eq. Vet. J.*, p.125-132, 1998.
- POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis., *Eq. Vet. J.*, v.28, p.38-46, 1996.
- POLLITT CC. The role of arteriovenous anastomoses in the pathophysiology of equine laminitis. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. v. 37p. 711-720, 1991.

- RAABE O, SHELL K, WÜRTZ A, REICH CM, WENISCH S, ARNHOLD S. Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Vet. Res. Comm.*, v. 35, p. 355-365, 2011.
- RENDLE D. Equine laminitis 1. Management in the acute stage. *In Practice*. v. 8, p. 434-443, 2006.
- RIBEIRO RM, MENDES HM, VALADARES RC, PAZ CF, OLIVEIRA, APL, JUNIOR OS, FALEIROS R R. A Novel Equine Hoof Lamellar Tissue Biopsy Technique. *J. Eq. Vet. Sci.*, v. 49, p. 63-68, 2017.
- RIO TINTO JJM, ALVES GES, FALEIROS RR, SANTOS RL, MARQUES JÚNIOR AP, MELO EG. Hydrocortisone in horses submitted to jejunal ischemia and reperfusion and its effects in the laminar corium. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v. 56, p. 292-299, 2004.
- RUCKER A. The Digital Venogram. In: J. K. Belknap, *Equine Laminitis Iowa*: Wiley Blackwell. p. 240-251, 2017.
- RUCKER A, ORSINI JA. Laminitis. Em J. A. Orsini, & T. J. Divers, *Equine Emergencies Treatment and Procedures*. St. Louis: Elsevier. p. 697 – 712, 2014.
- RUCKER A. Chronic laminitis: strategic hoof wall resection. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v.26, p.197-205, 2010.
- RUCKER A. The digital venogram. In: A. E. Floyd, & R. A. Mansmann, *Equine Podiatry Missouri*: Saunders Elsevier. p. 328-346, 2007.
- SCHNABEL LV, FORTIER LA, McLLWRAITH CN, NOBERT KM. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *The Vet. J.*, v. 197, p. 570-577, 2013.
- SEMRAD SD, HARDEE GE, HARDEE MM, MOORE JN. Low dose flunixin meglumine: effects on eicosanoid production and clinical signs induced by experimental endotoxaemia in horses. *Eq. Vet. J.*, v. 19, p. 201-206, 1987.
- STEWART MC. Cell-based therapies: current issues and future directions. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Prac.*, v. 27, p. 393-399, 2011.
- STEWART ML. The use of the wooden shoe (Steward Clog) in treating laminitis. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v.26, p.207-214, 2010.
- TADROS EM, FRANK N, HOROHOV DW. Inflammatory cytokine gene expression in blood during the development of oligofructose-induced laminitis in horses. *Journ. of Eq. Vet. Science*. v. 33, p. 802-808, 2013.
- TERRY RL, MCDONNELL SM, VAN EPS AW, SOMA LR, LIU Y, UBOH CE, DRIESSEN B. Pharmacokinetic profile and behavioral effects of gabapentin in the horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, v. 33, p. 485–494, 2010.

- THOMAS SM, SLOVIS N, LK MAXWELL, KOLLIAS-BAKER C. fentanil transdérmico combinado com drogas anti-inflamatórias não-esteróides para analgesia em cavalos. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 18, p. 550-554, 2004.
- TREIBER KH, KRONFELD DS, HESS TM, BYRD BM, SPLAN RK., STANIAR WB. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 10, p. 1538-1545, 2006.
- TROUT DR, HORNOF WJ, LINFORD RL, O'BRIEN TR. Scintigraphic evaluation of digital circulation during the developmental and acute phases of equine laminitis. *Eq. Vet. J.*, v. 22, p. 416-421, 1990.
- VAN EPS A. General Clinical Aspects of the Laminitis Case. In: J. K. Belknap, & R. Geor, *Equine Laminitis Iowa: Wiley Blackwell*. p. 183 – 190, 2017.
- VAN EPS A, LEISE B, WATTS M, POLLITT C, BELKNAP J. Digital hypothermia inhibits early lamellar inflammatory signalling in the oligofructose laminitis model. *Eq. Vet. J.*, p. 230-237, 2012.
- VAN EPS AW. Acute laminitis: Medical and supportive therapy. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Prac.*, v. 1, p. 103-114, 2010.
- VAN EPS AW, POLLITT CC. Equine laminitis: cryotherapy reduces the severity of the acute lesion. *Eq. Vet. J.*, v. 36, p. 255-260, 2004.
- VIDAL MA, KILROY GE, LOPEZ MJ, JOHNSON JR, MOORE RM, GIMBLE JM. Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Vet. Surg.*, v. 36, p. 613-622, 2007.
- VIDAL MA, WALKER NJ, NAPOLI E, BORJESSON DL. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem cells and development*, v. 21, p. 273-283, 2011.
- VISSER MB, POLLITT CC. The timeline of metalloprotease events during oligofructose induced equine laminitis development. *Eq. Vet. J.*, v. 44, p. 88-93, 2012.
- WALSH DM, BRUNS TA. Historical perspective on equine laminitis s: Leukocytes. In: J. K. Belknap, *Equine Laminitis*. 1ed. Hoboken, NJ: Wiley, p. 122-151, 2017.
- WALSH DM, MCGOWAN CM, MCGOWAN TW, LAMB SV, SCHANBACHER BJ, PLACE NJ. Equine Cushing's disease/equine metabolic syndrome: a practitioner field study. In: *The Fourth International Equine Conference on Laminitis and Diseases of the Foot.*, West Palm Beach, Florida, USA. 2007.
- WAN CD, CHENG R, WANG HB, LIU T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepat. Pancr. Dis. Int.*, v. 7, p. 29–33, 2008.

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

WHITE NA. Equine laminitis. The Waltham International Nutritional Science Symposium, Washington DC, September 14, 2005.

WYLIE, CE, COLLINS, SN, VERHEYEN, KL, NEWTON, JR. Frequency of equine laminitis: A systematic review with quality appraisal of published evidence. *Vet. J.*, v. 3, p. 248-256, 2011.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÕES RADIOGRÁFICA, VENOGRÁFICA E DA TAXA DE CRESCIMENTO DO ESTOJO CÓRNEO EM EQUINOS COM LAMINITE CRÔNICA TRATADOS COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO

RESUMO

Os objetivos foram avaliar os efeitos da perfusão regional de células-tronco mesenquimais caracterizadas derivadas do tecido adiposo (adCTM) de equinos com laminite crônica estável. Seis éguas com laminite crônica estável, em tratamento padrão de realinhamento da falange distal no casco, foram submetidas a perfusões regionais da veia digital com adCTM (20 milhões de células, 3 infusões a cada 15 dias) comparadas com infusão de placebo no membro contralateral. As avaliações ocorreram em dois períodos de 30 dias, antes e posterior ao tratamento (a partir da segunda perfusão). Radiografias e venografias digitais foram realizadas em ambos os membros torácicos no início e ao final de cada período. A venografia foi avaliada por um sistema de escore de lesão vascular (redução da perfusão). O crescimento do estojo córneo foi monitorado pela distância entre a coroa e marcador radiopaco inserido na muralha dorsal. A avaliação da relação espacial entre falange distal e o estojo córneo foi obtida por software específico. Após o tratamento, apenas no grupo adCTM houve redução dos escores de lesão venográficos ($P<0,03$) em relação ao valor basal, com ênfase na perfusão dos vasos dorsais lamelares ($P<0,03$) e junção cincunflexa-lamelar ($P<0,03$), e maior distância (20%) de crescimento de estojo córneo ($P<0,03$) em comparação com os membros placebos. Efeitos positivos também foram detectados na relação espacial entre a falange distal e o estojo córneo dos membros tratados com adCTM, promovendo maior estabilidade da falange distal comparado ao grupo placebo. A terapia com adCTM promoveu melhorias na perfusão sanguínea digital, na taxa de crescimento e na relação espacial entre falange distal e estojo córneo. Nossos resultados confirmam o potencial terapêutico das adCTM no tratamento de cavalos com laminite crônica estável, devendo as infusões serem realizadas regionalmente em cada um dos membros afetados.

Palavras chave: Equinos, células tronco autólogas, venografia, laminite.

ABSTRACT

The objectives were to evaluate the effects of regional perfusion of characterized mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (adMSC) of horses with stable chronic laminitis. Six mares with stable chronic laminitis in standard treatment of distal phalangeal realignment in the hull were submitted to regional perfusion of the digital vein with adMSC (20 million cells, 3 infusions every 15 days) compared to placebo infusion in the contralateral limb. Evaluations occurred in two 30-day periods, before and after treatment (from the second infusion). Radiographs and digital venographs were performed on both thoracic limbs at the beginning and end of each period. Venography was evaluated by a vascular lesion score system (reduction of perfusion). The growth of the hoof capsule was monitored by the distance between the crown and radiopaque marker inserted in the wall of the hoof. The evaluation of the spatial relationship between the distal phalanx and the hoof capsule was obtained by specific software. After the treatment, only the adCTM group had a reduction in venographic lesion scores ($P < 0.03$) compared to baseline, with emphasis on perfusion of lamellar dorsal vessels ($P < 0.03$) and circumflex-lamellar junction ($P < 0.03$), and greater distance (20%) growth of hoof capsule ($P < 0.03$) compared to placebo limbs. Positive effects were also detected in the spatial relationship between the distal phalanx and the hoof capsule of limbs treated with adMSC, promoting greater stability of the distal phalanx compared to the placebo group. adMSC therapy promoted improvements in digital blood perfusion, growth rate, and spatial relationship between distal phalanx and hoof capsule. Our results confirm the therapeutic potential of adMSC in the treatment of horses with stable chronic laminitis, and infusions should be performed regionally in each of the affected limbs.

Key words: Equine, autologous stem cells, venography, laminitis.

1. INTRODUÇÃO

A laminite é uma enfermidade secundária do dígito do equino que resulta em falência estrutural do mecanismo de aderência do estojo córneo ao esqueleto apendicular (Noschka et al., 2009, Eades, 2010b; Pollit & Visser, 2010). Esta condição possui alta relevância clínica, podendo afetar até 34% dos cavalos e sua evolução muitas vezes culmina na eutanásia, devido ao comprometimento do bem-estar dos animais (Wylie et al., 2011). O diagnóstico precoce em casos de laminite moderada associada à pronta implementação da terapia é fundamental para melhorar a chance do reestabelecimento desses animais. A associação de venografias às radiografias pode fornecer informações importantes na determinação do

quadro clínico e auxiliar na tomada de decisão sobre qual tratamento deve ser realizado. A venografia digital pode evidenciar as lesões vasculares no estojo córneo, mesmo antes de ocorrer alterações radiográficas (Eastman et al., 2012).

Outro fator importante e que se deve ter em consideração é que o tratamento da laminite pode se tornar longo e oneroso e, assim, existe necessidade urgente para explorar o potencial de novas estratégias preventivas e terapêuticas para pacientes com ou em alto risco de desenvolver essa afecção. Neste contexto, uma modalidade terapêutica cada vez mais empregada é a terapia regenerativa, por meio da utilização de células tronco mesenquimais (CTMs) (Gugjoo & Sharma, 2018).

A técnica de terapia celular para laminite vem sendo utilizada por diversos profissionais do meio equestre, porém faz-se necessário a realização de estudos mais aprofundados a respeito de seu potencial terapêutico. Acredita-se que as CTMs promovam uma melhora na perfusão sanguínea e na taxa de crescimento do casco devido ao seu potencial angiogênico e promoção de liberação de fatores de crescimento, proliferação e diferenciação celular (Schnabel et al., 2013). Contudo tais condições ainda se limitam a relatos clínicos sem comprovação científica (Dryden et al., 2013; Schnabel et al., 2013; Morrison et al., 2014).

Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a perfusão sanguínea, a taxa de crescimento do casco e a relação espacial entre falange distal e estojo córneo em equinos com laminite crônica que receberam tratamento com adCTM infundidas por perfusão regional na veia digital em membro torácico comparando com o membro contralateral tratado com solução placebo. Adicionalmente, verificou-se possível efeito sistêmico das adCTM comparando-se os resultados obtidos do membro infundido com os do membro contralateral, tratado com placebo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção e Descrição de Casos Clínicos

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais de cuidados e uso de animais (CEUA/UFMG 282/2016). Foram utilizados seis equinos, Mangalarga Marchador, fêmeas não gestantes, com peso entre 381 ± 11 kg, com idade média de $8,3 \pm 4,7$ anos e escore corporal 6 ± 1 (escore 1 a 9). Estes animais foram atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, e identificados como portadores de laminite crônica por meio do histórico, e confirmados através de exame físico e radiológico. Foram selecionados animais que apresentaram histórico de laminite por ingestão de excesso de carboidratos e com tempo de afecção em torno de 10-15 dias, com sinais de claudicação equivalentes aos graus de Obel de 1 a 2 (Obel, 1948). A claudicação

foi avaliada em todos os equinos subjetivamente por dois veterinários. Radiografias bilaterais em membros torácicos e venografias digitais foram realizadas em todos os equinos. Também foram realizadas projeções digitais lateromedial e dorsoplantar dos membros pélvicos em todos os animais. Os equinos com rotação de falange superior a 10 graus e/ou com perfuração de sola foram descartados para este estudo. Os animais foram mantidos estabulados em baias individuais no setor de Cirurgia de Grandes Animais da Escola de Veterinária, com acesso à água e feno ad libitum e receberam 1% do seu peso corporal vivo de ração comercial Guabi Proequi Original (Nutriage – Guabi S. A., Além Paraíba, Minas Gerais) distribuído em duas administrações diárias até a finalização do estudo.

2.2 Avaliação da claudicação

Todos os seis animais foram avaliados para claudicação por dois veterinários. Os cavalos foram avaliados subjetivamente na caminhada/trote em linha reta em piso duro. Os animais com claudicação equivalente a graus de Obel 3 e 4 não foram utilizados neste estudo. Em todos os animais com grau 1 a 2 de claudicação foram realizados bloqueios perineurais em sesamóide abaxial para confirmar se a origem da claudicação era no estojo córneo.

2.3 Período de observação e tratamento inicial

Os animais admitidos passaram por um período de observação de 30 dias antes da aplicação das adCTM. Para tanto, realizou-se casqueamento corretivo e redistribuição de contato do casco com o solo por meio da colocação de tamancos de madeira e preenchimento da ranilha e sola com silicone de condensação a base de polidimetilsiloxano (Speedex Putty, (Coltene/Vigodent AS Indústria e Comércio) de acordo com protocolo de atendimento do serviço de Clínica Cirúrgica de Grandes Animais do Hospital Veterinário da UFMG. Logo após o casqueamento, aqueles animais que ainda apresentaram desconforto foram tratados por um período de até uma semana com fenilbutazona (4,4 mg/kg SID). Estes procedimentos objetivaram melhorar a condição álgica, impedir a progressão da rotação e proporcionar maior conforto aos animais, padronizando a terapia biomecânica durante até no máximo uma semana.

Durante todo o período, os animais foram examinados diariamente, realizando-se os exames radiográficos, a cada 15 dias nas projeções lateromedial e dorsopalmar e 65° proximodorsal-distopalmar a fim de se confirmar a estabilização da relação espacial entre falange e estojo córneo. Um marcador radiográfico metálico de comprimento conhecido foi aderido à superfície dorsal do casco a partir da banda coronária, com intuito de servir como referência

para as medidas radiográficas. Assim, antes do início do estudo todos os animais foram considerados portadores de laminite crônica estável. A partir deste momento nenhum outro medicamento foi utilizado até a finalização do estudo.

A cronologia de realização de todas as etapas do experimento está descrita conforme a Figura 1.

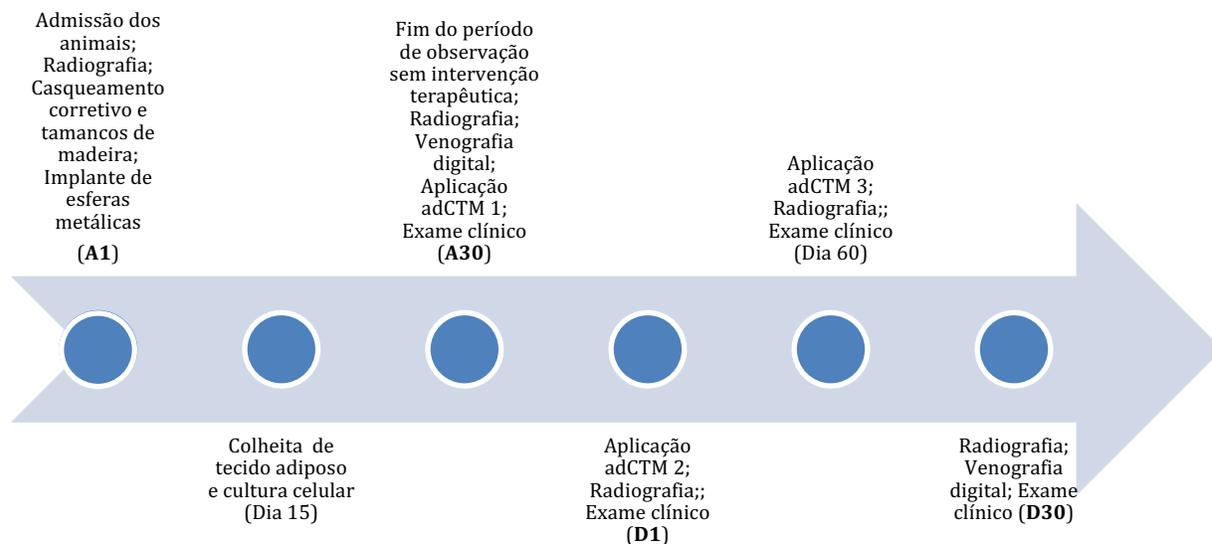


Figura 1: Cronologia de realização do experimento

2.4 Colheita de tecido adiposo e cultura celular

Quinze dias após a admissão no experimento, foi colhida uma amostra de tecido adiposo de cada equino. Antecedendo a colheita, o animal foi mantido em jejum alimentar de 12 horas, submetido a sedação com xilazina 10% (0,7 mg/kg/IV), observado quanto ao comportamento, sendo considerado a sedação adequada quando animal estivesse com a cabeça abaixo da altura da escápula. Neste momento realizou-se tricotomia na região acima do músculo glúteo dorsal, na base da cauda, antissepsia e anestesia local utilizando bloqueio em L invertido próximo a esta região (local de coleta de tecido adiposo). Foi realizada uma incisão de aproximadamente 4-5 cm de comprimento paralelamente à cauda, permitindo a visualização de uma camada de tecido adiposo entre a pele e a musculatura. Após dissecação do tecido subcutâneo, foram coletadas amostras de tecido adiposo de aproximadamente 1,0 cm³ (2,0 gramas), e armazenadas em tubo Falcon estéril de 50,0 mL, contendo meio de

cultura celular (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium) acrescido de SFB (Soro Fetal Bovino). A pele foi suturada com nylon 2-0 em padrão simples separado. As amostras foram encaminhadas imediatamente para processamento em laboratório de cultura.

Toda as etapas de cultura celular foram realizadas no Laboratório de Estudos em Resolução da Resposta Inflamatória no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Em fluxo laminar, esse tecido foi submetido a lavagens sucessivas com PBS, cortados em pequenos pedaços e transferidos para outro tubo Falcon de 15,0 mL contendo solução de colagenase do tipo I (Sigma, St Louis MO, USA) para ação digestiva, por 60 minutos, em estufa a 37°C, 5% de CO₂, agitado a cada 15 minutos. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 694G (2000 rpm) durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 10,0 ml de PBS, sendo centrifugado novamente. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 10,0 mL de meio DMEM acrescido de SFB.

Uma alíquota deste volume foi utilizada para contagem celular em câmara de Newbauer. Logo após as células foram semeadas em garrafas de 75 cm² com densidade de 27×10^3 por cm² e incubadas em meio de crescimento básico contendo DMEM (baixa glicose) suplementadas com 10% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina e 0,1% de anfotericina (DMEM completo) à 37° C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. Esta fase de crescimento celular inicial foi chamada de passagem 0 (P0). Aproximadamente 96-120 horas, foram identificadas células aderentes agrupadas em nichos, as células não aderentes foram descartadas e o meio de cultura trocado. As células foram monitoradas diariamente, em microscópio invertido de contraste de fase, sendo o meio de cultura trocado a cada dois/três dias, de acordo com o metabolismo celular, avaliados por meio da morfologia das células, confluência da cultura e características físicas do meio de cultura.

As células permaneceram em estufa, até a confluência de 80%. Após esta característica ser identificada, o meio de cultura foi totalmente desprezado e a cultura foi tripsinizada (Trypsina-EDTA 1x) e incubada a 37° C, durante 5 minutos. Após esse período, a ação da tripsina foi inativada com acréscimo de meio DMEM completo. A solução foi transferida para um tubo de centrifuga e centrifugada à temperatura de 22° C e 694G por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente desprezado e o pellet celular (P1) (Figura 2) ressuspensionado em meio DMEM completo, e novamente dividido em garrafas de cultura, mantendo a mesma densidade celular anteriormente informada. A cada nova confluência de 80%, o procedimento foi repetido até atingir a quarta passagem celular (P4).



Figura 2: Solução centrifugada contendo tecido adiposo removida da base da cauda de equinos. Observa-se pellet celular (P1) obtido após a tripsinização.

2.5 Diferenciação celular

Esta etapa foi realizada no *Equine Health Studies Laboratory* na Louisiana State University como colaboração.

Seguindo os padrões da Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy* - ISCT), as adCTM foram diferenciadas em tri-linhagem (adipogênica, osteogênica e condrogênica) para demonstrar sua multipotencialidade, de acordo com os requisitos estabelecidos para garantir a caracterização de CTMs de equinos (De Schauwer et al., 2011). Todas as diferenciações foram realizadas em triplicata e uma amostra foi mantida em meio basal (células controle) durante 14 dias (adipogênica e osteogênica) e 21 dias (condrogênica).

Para diferenciação adipogênica, as células P3 foram plaqueadas a 20.000 células / cm² em placas de seis poços e cultivadas sob condições adipogênicas por 14 dias. O meio (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, EUA) foi trocado a cada 3 dias, as células foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 10 minutos, enxaguadas com PBS e coradas com *Oil Red O* (Gibco, Grand Island, NY, EUA) de acordo com fabricante.

Para realizar a caracterização osteogênica de adCTM, as células P4 foram plaqueadas a 20.000 células / cm² em placas de seis poços e cultivadas em condições osteogênicas por 14 dias, o meio (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, EUA) foi trocado a cada três dias, as células foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 10 minutos, enxaguadas com água estéril

e coradas com Vermelho de Alizarina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) de acordo com fabricante.

Para diferenciação condrogênica, as células P4 foram plaqueadas a 20.000 células / cm² em placas de 6 poços e cultivadas em condições condrogênicas por 21 dias. O meio STEMPRO® (Gibco, Grand Island, NY, EUA) foi usado para diferenciação condrogênica e foi trocado a cada 3 dias. As células foram fixadas com formalina tamponada a 10% durante 10 minutos. Para detectar a diferenciação condrogênica, as células foram coradas com *Alcian Blue* em pH 2,5.

2.6 Preparação e aplicação das células para infusão em solução de NaCl 0,9%

Após a terceira passagem, outras amostras de células foram tripsinizadas (P4), observadas em microscopia óptica para a avaliação da viabilidade celular, submetidas a contagem em câmara de Newbauer e aliqüotadas na concentração de 2×10^7 células/ 3 ml de PBS (Spriet et al., 2013). Cada aliqüota foi armazenada em seringa de 20 ml, sendo utilizada solução fisiológica NaCl 0,9% para completar o volume da seringa. Após isso, foi transportada para o centro cirúrgico, aguardando o momento da aplicação. Todas as etapas de cultivo celular foram repetidas por mais duas vezes, totalizando três aplicações com intervalos de 15 dias entre as mesmas. Em um membro torácico foi aplicado o tratamento celular e o outro apenas solução fisiológica NaCl 0,9% (solução placebo) no mesmo volume de aplicação. Foram colocados torniquetes nos membros, na altura do sesamóide abaxial, e em seguida realizada a infusão por perfusão regional na veia digital palmar, e mantido durante 30 minutos. A decisão sobre qual seria o membro tratado e o membro placebo foi tomada por sorteio.

2.7 Segurança de Procedimentos Clínicos

O estado clínico de cada equino incluso no estudo foi monitorizado desde sua chegada, ao longo dos primeiros trinta dias de acompanhamento prévio ao tratamento e durante as duas semanas seguintes a cada tratamento, avaliando a presença de edema na parte distal dos membros onde foram infundidas células ou solução placebo, eventual inchaço, dor ou outros sintomas não relacionado com a laminite. A temperatura, a respiração e a frequência cardíaca foram avaliadas duas vezes ao dia.

2.8 Venografia digital

Com intuito de verificar a perfusão sanguínea do casco, venogramas digitais foram realizados em ambos os membros torácicos de acordo com descrito por Redden (2001). Resumidamente, os cavalos foram sedados com detomidina (0,01 mg / kg IV) e realizado bloqueio perineural do nervo digital palmar na região abaxial do sesamóide (Lidocaína 2% sem vasoconstritor, 40 mg por local de aplicação). Os cascos foram limpos para remoção de sujeira e detritos. Um torniquete foi aplicado sobre o boleto no nível dos ossos sesamóides proximais. Os cavalos foram posicionados com os dois membros torácicos em blocos radiográficos para uma distribuição de peso uniforme. Um scalp de calibre 21 foi colocado na veia digital palmar. Foram administrados 20 ml de iohexol (Omnipaque Iohexol 300 mg / ml, GE Healthcare, Princeton, NJ). A quantidade de contraste utilizada e os tempos de infusão foram registrados para cada membro. A qualidade da perfusão foi registrada como boa, aceitável ou precisa ser repetida. Imediatamente após a conclusão da infusão de contraste, imagens radiográficas foram obtidas em sucessão: lateromedial, horizontal dorsopalmar, 65° proximodorsal-distopalmar, em no máximo 90 segundos após aplicação do contraste. Após a obtenção das imagens, o torniquete foi removido e a veia ocluída. Uma bandagem leve para manter a pressão sobre a veia digital palmar foi deixada no local por 10 minutos e depois removida. Os locais de injeção foram avaliados quanto a inchaço, calor ou dor aos 30 minutos e 24 horas após a infusão. Cada projeção foi avaliada para o nível de preenchimento vascular em locais pré-determinados (Figura 3), pré e pós-tratamento (15 dias após a última infusão do tratamento).

Para avaliação das venografias utilizou-se um sistema de escores desenvolvido por Leise et al., (2016) (Tabela 1) com intuito de avaliar a qualidade e a quantidade de preenchimento vascular nos seguintes locais: plexo coronário lateral e medial, vasos dorsais sublamelares, junção circunflexa lamelar, papilas terminais, arco terminal e vascularização digital solear.

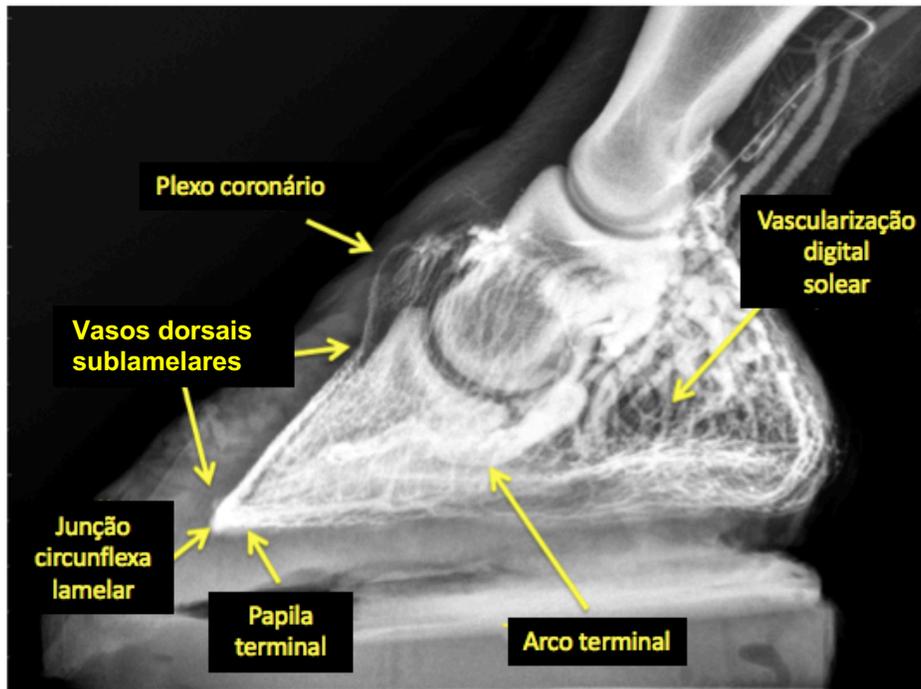


Figura 3: Venografia digital de equino saudável. Principais locais de avaliação da vasculatura digital. Fonte: Leise 2016 (comunicação pessoal).

Tabela 1: Escore de avaliação de achados venográficos em cavalos com laminite crônica.

Locais avaliados	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Plexo coronário	Definição normal por detalhes nítidos de contraste em vasculatura. Os vasos são orientados no mesmo plano que o aspecto dorsal da P3 e inicia proximal para o processo de extensor de P3. É esperado alguma assimetria medial a lateral da projeção DP, com base no levantamento de peso e na conformação do pé	Vasos orientados numa direção dobrada, horizontal.	Vasos orientados numa direção dobrada, horizontal com alongamento e distorção. Diminuição da largura e quantidade de contraste no plexo é notada.	Ausência de contraste durante suporte de peso de e redução do contraste sem peso.
Vasos dorsais sublamelares	Definição normal por detalhes nítidos de contraste em vasculatura. Os recipientes são orientados paralelamente a P3 em uma linha distinta a aproximadamente 4 mm do osso nos aspectos dorsal, medial e lateral. O preenchimento de contraste é consistente ao longo do comprimento do aspecto dorsal do P3.	Distorção leve da vasculatura / contraste com ligeiro alargamento da vasculatura.	Distorção moderada da vasculatura, com redução do contraste dorsal proximal e ausência de contraste distal.	Ausência de suporte de peso de contraste e redução do peso sem contraste.
Papila terminal	Definição normal por detalhes nítidos de contraste em vasculatura. Os vasos são orientados no mesmo plano que o aspecto dorsal do P3. Cavalos com 15-20 mm de sola terão papilas terminais aprox. 10 mm de comprimento.	Redução dos vasos de comprimento e / ou alteração da direção das papilas	Perda de definição dos vasos com papilas orientadas no plano horizontal. Diminuição do contraste ou o desfocagem de material de contraste pode ser notado.	Ausência de contraste durante suporte de peso e redução do contraste quando sem peso.
Junção circunflexa lamelar	Definição normal por detalhes nítidos de contraste em vasculatura. Forma distinta em aprox. Ângulo de 50 graus na vista lateral.	Distorção leve da vasculatura / contraste.	Distorção moderada de vasculatura / contraste presente com desfocagem ou diminuição do material de contraste observado. O P3 deslocado abaixo dos vasos circunflexos seria indicativo da rotação do P3.	Ausência de contraste durante suporte de peso e redução do contraste durante sem peso.
Arco terminal	Definição normal por detalhes nítidos de contraste em vasculatura.	Redução leve do enchimento do contraste.	Perda moderada de preenchimento de contraste.	Ausência de contraste durante suporte de peso e redução do contraste quando sem peso.
Vascularização digital solear	Definição normal por detalhes nítidos de contraste em vasculatura e preenchimento completo de toda a almofada digital.	Redução leve no preenchimento do contraste.	Redução moderada no contraste.	Ausência de contraste durante suporte de peso e redução do contraste quando sem peso.

Adaptado de Leise et al., 2016.

2.9 Crescimento do estojo córneo e exames radiográficos

Como método de avaliação da taxa de crescimento do estojo córneo, foi utilizado o implante de esferas metálicas na muralha do casco dos animais deste estudo (Figura 4), no dia A1. Primeiramente os animais foram radiografados com auxílio de um marcador radioluscente na muralha do casco, para verificar a medida adequada que iria permitir realizar o implante das esferas o mais próximo das lamelas epidermais, sem que ocasionasse lesão das mesmas. Após a realização das medidas com fita métrica, foi feita uma perfuração por meio broca de diâmetro compatível com a esfera metálica (2mm) montada em furadeira, padronizado ao centro da referência da largura do casco e 2 cm abaixo da banda coronária do casco. O número de esferas implantadas foi calculado com base na distância da superfície externa à linha do estrato lamelar, visualizada pelo raio x. Posteriormente, foi realizada a colocação das esferas no orifício obtido, com auxílio de uma pinça hemostática. Para manter as esferas no orifício, colocou-se uma massa acrílica ocluindo o mesmo. Ainda foi realizada radiografia imediatamente após a colocação das esferas para verificar o resultado do procedimento.

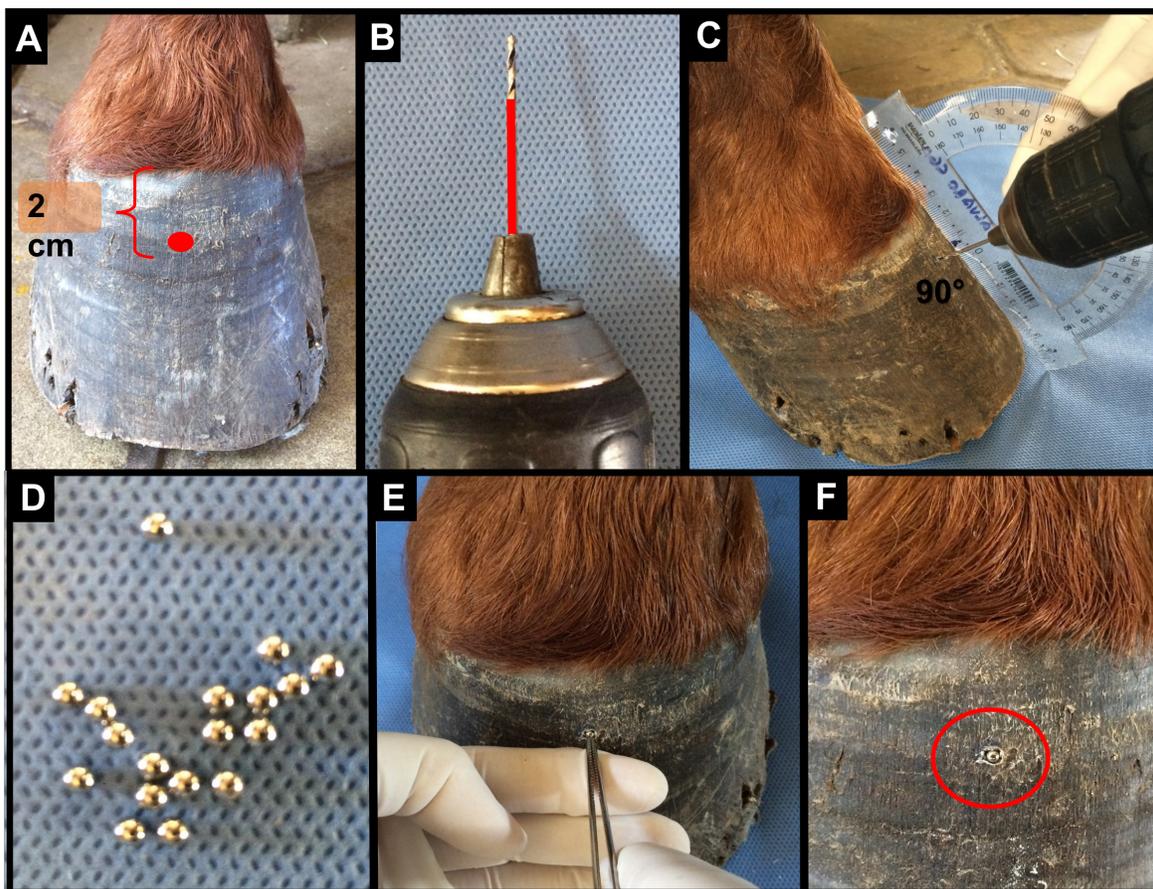


Figura 4: Sequência fotográfica do procedimento de colocação do implante de esferas metálicas. (A) Delimitação do acesso, localizado a 2 cm da coroa dorsal do casco, (B) marcação da profundidade de cada casco, (C) perfuração realizada em um ângulo de 90 graus. (D) Esferas metálicas esterilizadas em autoclave. (E) Colocação do implante de esferas metálicas. (F) Detalhe do implante após finalizado.

Protocolos radiográficos foram seguidos para eliminar a variabilidade na qualidade da imagem. Para a projeção lateromedial (Figura 4), o feixe de luz primário foi centrado a meio caminho entre o dígito e o talão e posicionado 15 mm acima da superfície de sustentação do peso do casco. Uma distância focal de 80 cm entre o chassi e o aparelho foi mantida para cada imagem adquirida, respeitando sempre o posicionamento do chassi perpendicular ao feixe primário. Para esse exame foi utilizado um aparelho de raio x portátil Orange 1060HF 90KV (EcoRayCo., LTDA, Woolin Lions Valley, Seoul, Korea), sempre com 80Kv e 2,5 mAs.

A monitoração do crescimento do estojo córneo foi acompanhada com base em quatro momentos. Para monitoração do crescimento antes da aplicação de qualquer tratamento, foram realizados dois exames radiográficos com trinta dias de intervalo (A1 e A30). Para se verificar o efeito pleno das adCTM foram considerados dois momentos também com trinta dias de intervalo, um quinze dias após a terceira aplicação de adCTM (D30) e outro trinta dias antes deste momento final (D1).

A mensuração do crescimento do estojo córneo foi baseada na distância entre a borda coronária e o ponto de inserção das esferas no plano mais dorsal do estojo córneo, por meio do programa computacional Metron Hoof-Pro (Software de imagem Metron Hoof Pro, Eponatech, Inc., P.O. Box 361, Creston, CA 93432).

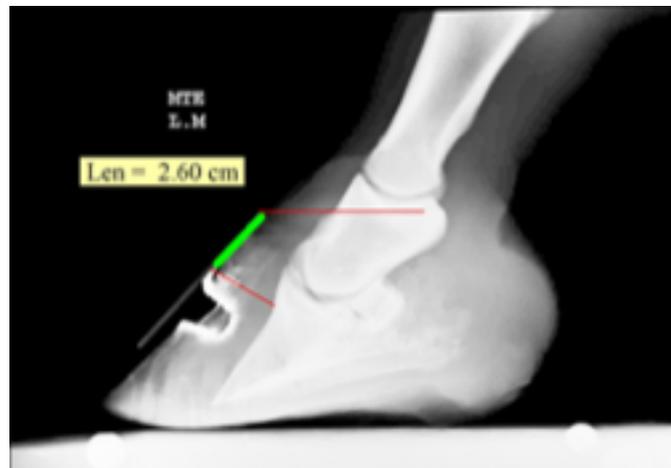


Figura 5: Imagem radiográfica lateromedial de falange distal de membro torácico esquerdo em um equino com laminite crônica. Nota-se a presença de esferas metálicas implantadas para verificar o crescimento de estojo córneo, e o marcador metálico a partir da coroa na muralha dorsal.

2.10 Avaliação da relação espacial entre a falange distal e o estojo córneo

As imagens radiográficas obtidas foram avaliadas através do programa computacional Metron Hoof-Pro (Software de imagem Metron Hoof Pro, Eponatech, Inc., P.O. Box 361, Creston, CA 93432). Conforme o que foi descrito por Thrall (2002) e Pollitt (2008), foram obtidas as medidas para as seguintes variáveis: ângulo da parede dorsal do estojo córneo (ângulo do casco), ângulo da falange distal, ângulo entre as superfícies dorsais da falange distal e da parede do estojo córneo (rotação), ângulo palmar, distâncias entre as superfícies dorsais da falange distal e da parede do estojo córneo proximal (CF Prox.) e distal (CF Distal),

comprimento da falange média, espessura de sola e distância entre os planos horizontais entre a banda coronária e o ápice do processo extensor da falange distal (afundamento). Sempre antes de realizar as mensurações utilizava-se o comprimento do marcador radiopaco para corrigir o fator de ampliação (Figura 5 e 6).

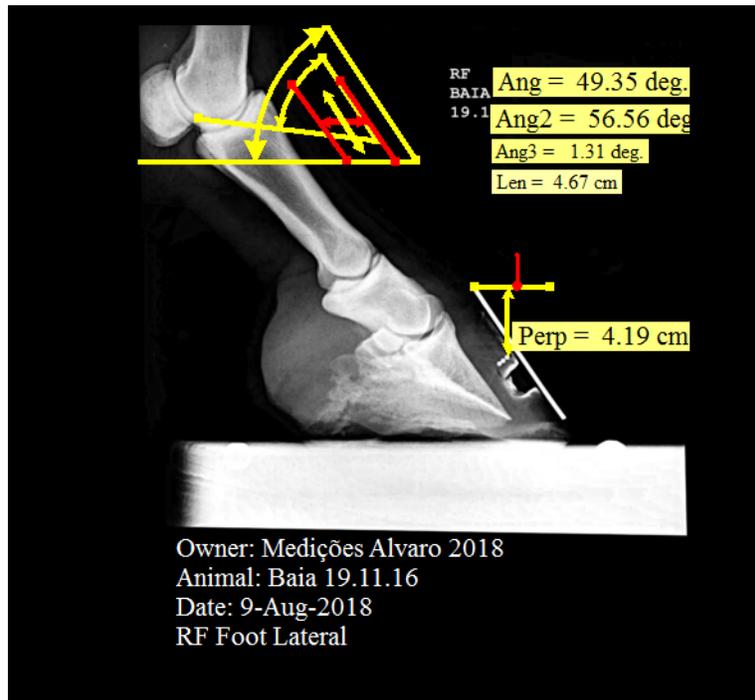


Figura 6: Imagem de mensuração radiográfica realizada em estojo córneo de membro torácico de um equino com laminite crônica por meio do software Metron Hoof Pro após realização de calibração e a marcação livre para ângulo do casco, ângulo da falange, ângulo de rotação, crescimento linear.



Figura 7: Imagem de mensuração radiográfica realizada em estajo córneo de membro torácico de um equino com laminite crônica por meio do software Metron Hoof Pro após realização de calibração e a marcação guiada, gerando resultados para as variáveis afundamento, ângulo palmar, espessura de sola, CF Prox., CF Distal.

2.11 Análise estatística

Os dados foram avaliados através do teste de normalidade Kolmogorov Smirnof. Variáveis que não atingiram normalidade (escore venográfico e ângulo de rotação) foram analisadas pelo teste de Freedman para comparar os tempos em cada grupo e o teste de Wilcoxon para comparar grupos dentro do mesmo tempo. Para os dados com distribuição normal, os tempos dentro de cada grupo foram submetidos a análise de variância em blocos ao acaso com o teste de Student Newman Keuls para comparação de médias. Os grupos dentro de cada tempo foram comparados pelo teste T-Student pareado. Foram considerados significativos resultados $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Foram realizadas, em seis cavalos, um total de 24 venografias com sucesso. Dois cavalos tiveram um casco em que a venografia não foi executada adequadamente devido ao

escapamento perivascular do agente de contraste durante a injeção, porém os mesmos foram repetidos no mesmo dia. O tempo para a administração do contraste levou em média 35 segundos (IC 95% = 27-43 segundos). A veia digital lateral foi utilizada em 19 procedimentos e a veia digital medial foi usada para cinco procedimentos. Todas as imagens radiográficas foram obtidas em um tempo médio de 90 segundos (IC 95% = 87-93 segundos) após a perfusão.

A evolução da doença foi monitorada por meio de exame clínico, radiografia e venografia. Cada animal demonstrou uma melhora constante no movimento e no uso dos membros afetados e houve melhoria na condição física geral. Sinais típicos de laminite, como pulso digital, relutância a mover-se e andar e comprometimento da posição quadrupedal, bem como claudicação e postura antiálgica, melhoraram gradualmente a partir da segunda semana após a primeira infusão dos tratamentos.

Tanto o exame do aspecto externo na inspeção visual quanto a palpação do estojo córneo com laminite evidenciaram uma melhora dentro de 45 dias após o início do protocolo terapêutico, principalmente entre o segundo e o terceiro tratamento no grupo adCTM (Figura 7).

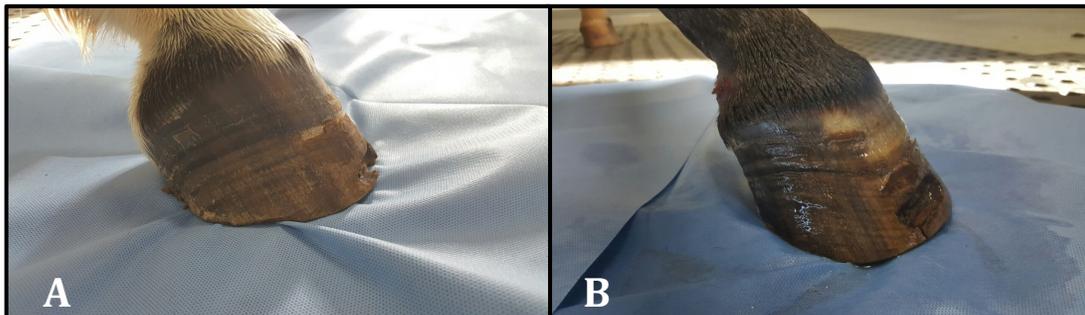


Figura 8: Aspecto macroscópico do estojo córneo de equino com laminite crônica. (A) Membro torácico direito 15 dias após terceira infusão de adCTM. (B) Membro torácico esquerdo 15 dias após terceira infusão de NaCl 0,9%.

3.1 Cultura celular e diferenciação das adCTM

A incisão de pele realizada para coleta cicatrizou sem complicações em todos os equinos. As colônias das células semelhantes a fibroblastos foram observadas em todos os cultivos após um dia de isolamento e plaqueamento. A cultura celular foi mantida até a quarta passagem utilizando amostras dos animais selecionados para o estudo. A capacidade das adCTM de

diferenciação em tri-linhagem foi confirmada utilizando os meios de diferenciação comercial para humanos (Gibco, Grand Island, NY, USA) (Figura 8).

A diferenciação osteogênica foi confirmada com a coloração em *Alizarin Red* das células diferenciadas, permitindo a visualização do depósito de cálcio formado durante a diferenciação osteogênica foi corado em vermelho. A diferenciação adipogênica foi comprovada pela coloração com *Oil red O*, permitindo a visualização das gotículas de lipídeos dentro das células. O potencial condrogênico foi verificado utilizando o sistema de cultura em forma de pellet. As células submetidas à diferenciação condrogênica mostraram-se coradas em azul após marcação com *Alcian Blue* devido à presença dos proteoglicanos sulfatados produzidos na matriz extracelular condral durante a diferenciação em cartilagem. Em todas as diferenciações, as culturas controles (meio basal) não exibiram diferenciação.

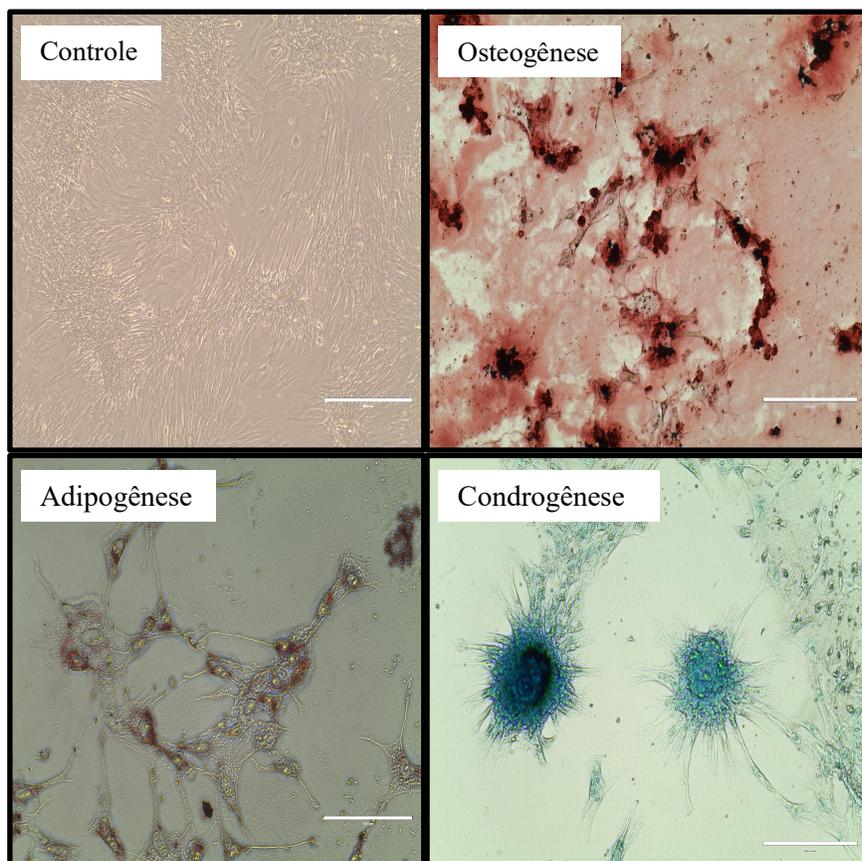


Figura 9: Fotomicrografias das adCTM diferenciadas em tri-linhagem das adCTM. Na diferenciação osteogênica é possível observar depósito de cálcio corado com Vermelho de Alizarina. Para diferenciação adipogênica nota-se pequenas gotículas de lipídeos presentes no citoplasma celular corados com *Oil Red O*. Diferenciação condrogênica onde as células foram coradas com *Alcian Blue* para demonstrar a produção de proteoglicanos mostrados em azul por condrócitos.

Nenhum dos lotes de adCTM utilizados para a terapia foi contaminado por bactérias ou leveduras.

3.2 Segurança de Procedimentos Clínicos

Não foram observadas reações adversas locais ou sistêmicas após as perfusões de adCTM autólogas. Nenhum dos equinos apresentou sinais clínicos atribuíveis à microcoagulação intravascular ou trombose. Em particular, em nenhum caso houve reação local associada a problemas vasculares agudos (hiperemia, aumento de temperatura, edema, dor após a palpação) observada.

3.3 Eficácia e resultado da terapia

3.3.1 Análise venográfica

Não houve qualquer tipo de diferença estatística considerando o grupo placebo. No grupo adCTM, considerando a soma dos escores, o que envolve todas as variáveis estudadas, houve uma melhora significativa 15 dias após a terceira aplicação de adCTM quando comparado ao exame pré-tratamento ($P < 0,03$). Essa diferença também se manifestou especificamente nas variáveis perfusão de vasos dorsais lamelares (VDL, $P < 0,03$) e junção circunflexa-lamelar (JCL, $P < 0,03$) (Figura 10 e 11).

Grupo Placebo

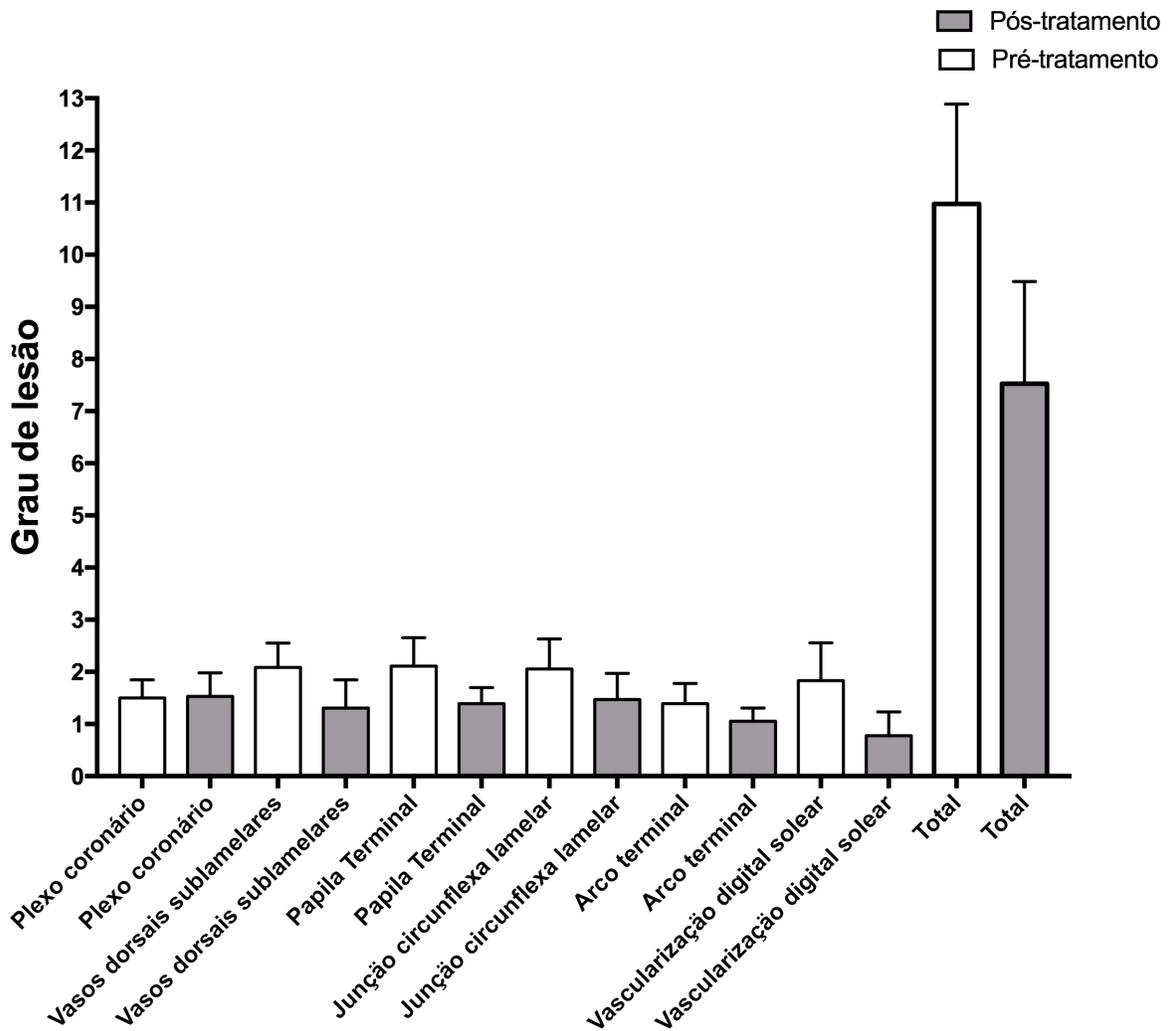


Figura 10: Valores médios e desvio padrão de escores para perfusão vascular obtidos por venografia em equinos com laminite crônica pré-tratamento (barra branca) e pós-tratamento (barra escura) com NaCl 0,9% (placebo) por perfusão regional venosa.

Grupo adCTM

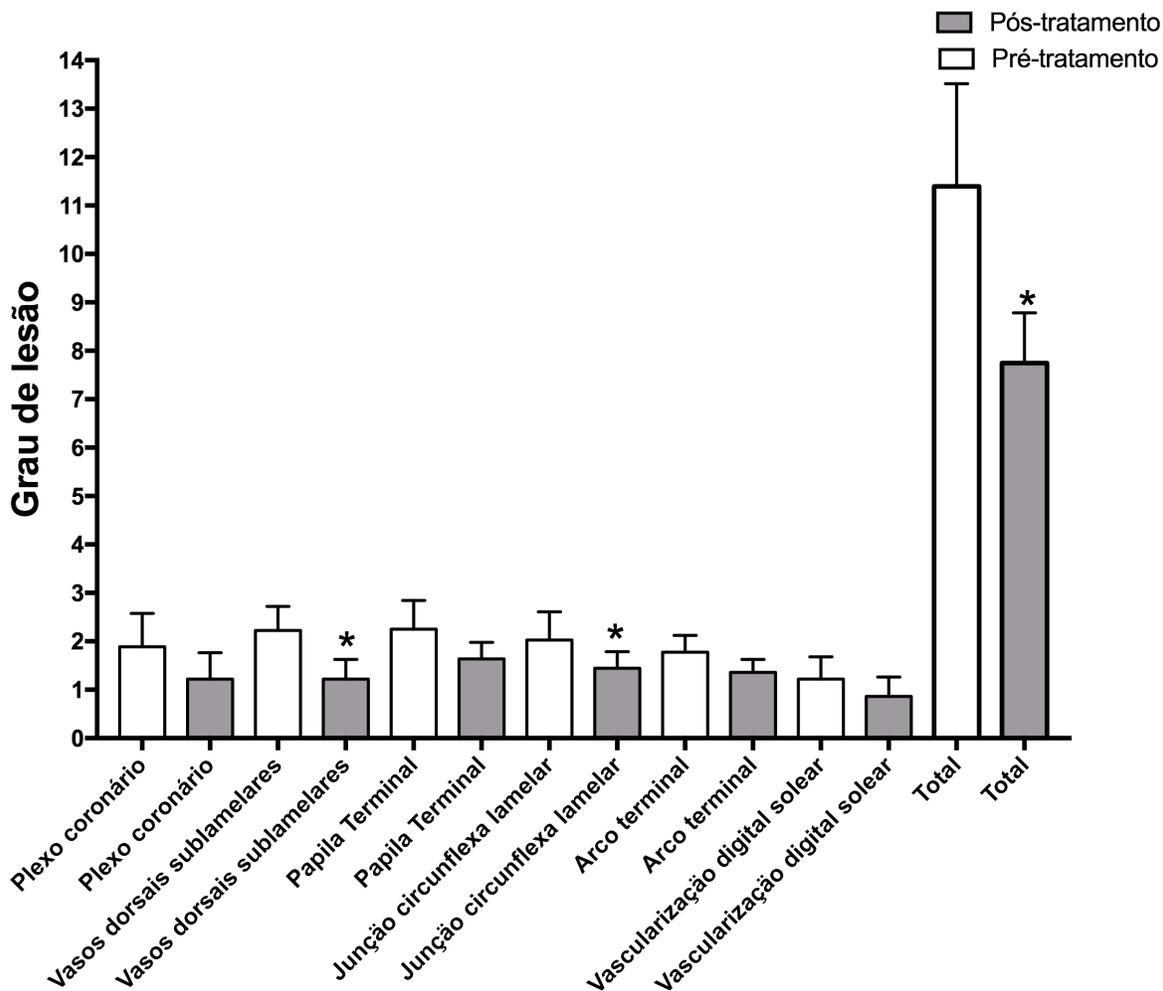


Figura 11: Valores médios e desvio padrão de escores para perfusão vascular obtidos por venografia em equinos com laminite crônica pré-tratamento (barra branca) e pós-tratamento (barra escura) com adCTM por perfusão regional venosa. * Diferença significativa entre os tempos no mesmo grupo ($P < 0,03$).

3.3.2 Taxa de crescimento do estojo córneo

Em ambos os grupos houve um aumento da distância entre a borda coronária e o ponto de inserção das esferas tanto antes (A1-A30) quanto depois (D1-D30) da aplicação de adCTM ou placebo, demonstrando o crescimento do casco em ambos os grupos. Entretanto na comparação ao final dos tratamentos (D30) entre os grupos verificou-se que os membros tratados com adCTM obtiveram maior distância quando comparados com membros placebos ($P < 0,03$) (Figura 12).

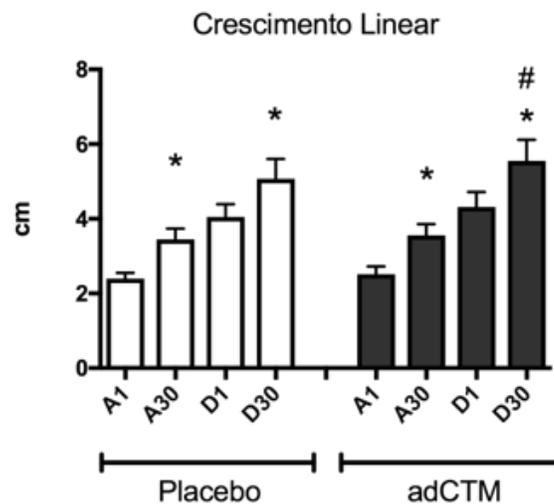


Figura 12: Valores médios e erros-padrão em centímetros (cm) obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação da distância linear entre a coroa do casco e o marcador em equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa. *Diferença significativa entre os tempos A1 e A30 ou D1 e D30 no mesmo grupo ($P < 0,05$). #Diferença significativa nos tempos entre os grupos ($P < 0,03$).

3.3.3 Relação espacial entre a falange distal e o estojo córneo

Os resultados das medidas radiográficas estão representados nas Figuras 13,14,15, 16 e 17.

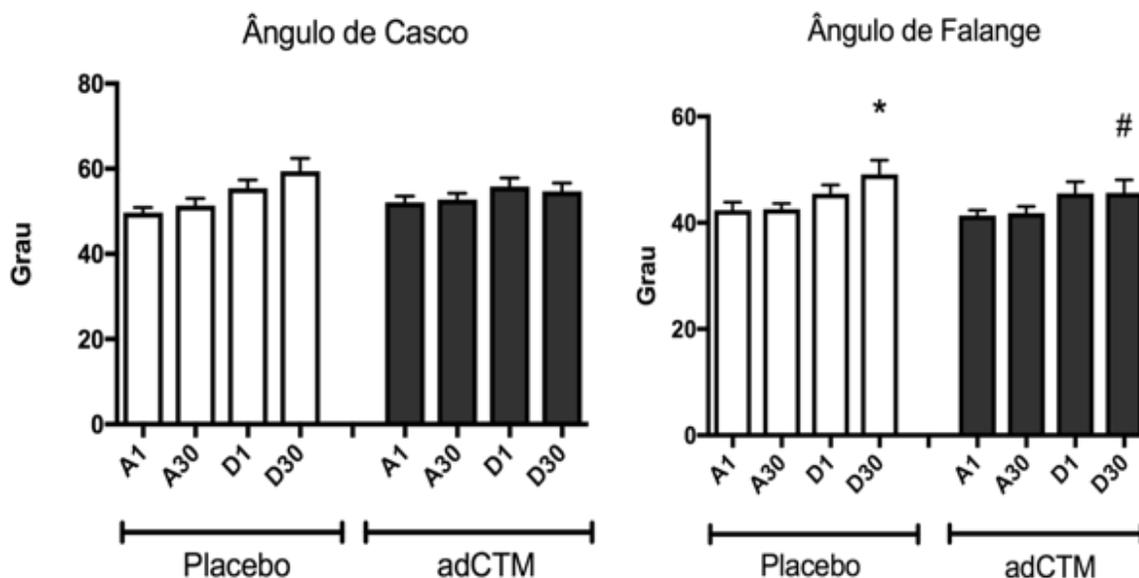


Figura 13: Valores médios e erros-padrão em graus obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para ângulo do casco e ângulo de falange distal em equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa. *Diferença significativa entre os tempos A1 e A30 ou D1 e 30 no mesmo grupo. #Diferença significativa nos tempos entre os grupos.

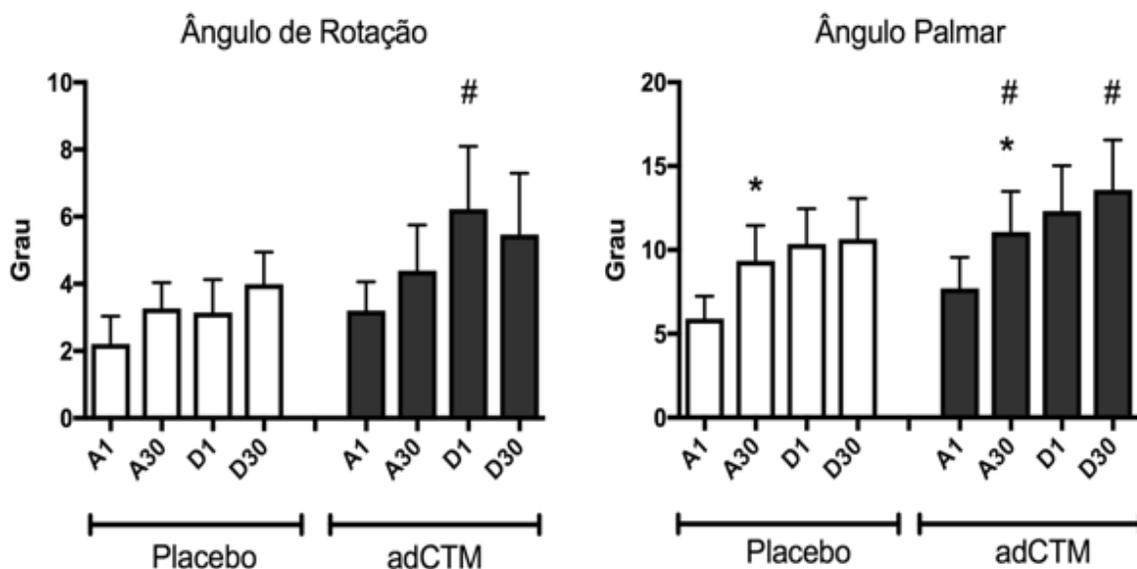


Figura 14: Valores médios e erros-padrão em graus obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para ângulo de rotação e ângulo palmar em equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa. *Diferença significativa entre os tempos A1 e A30 ou D1 e 30 no mesmo grupo. #Diferença significativa nos tempos entre os grupos

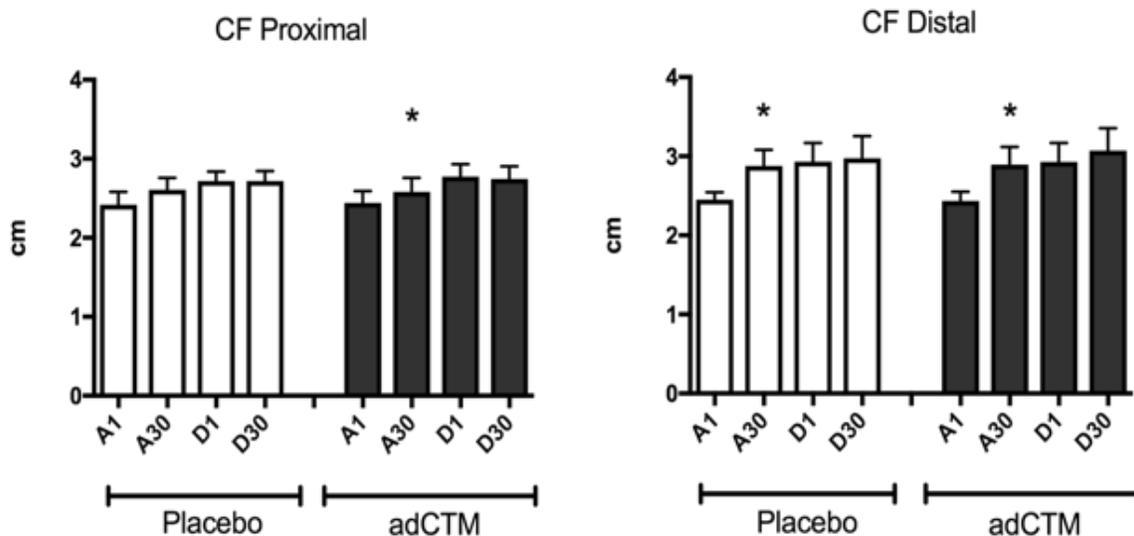


Figura 15: Valores médios e erros-padrão em centímetros (cm) obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para casco/falange proximal e casco/falange distal em equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa*Diferença significativa entre os tempos A1 e A30 ou D1 e 30 no mesmo grupo ($P < 0,05$).

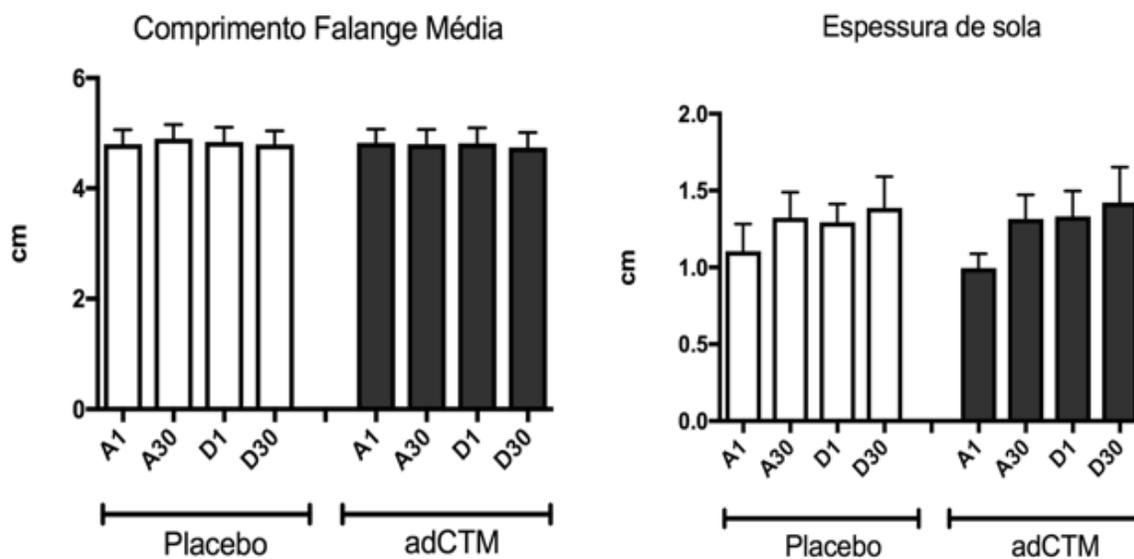


Figura 16: Valores médios e desvio padrão em centímetros (cm) obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para comprimento de falange média e espessura de sola em equinos com laminite crônica, antes (A1, A30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa.

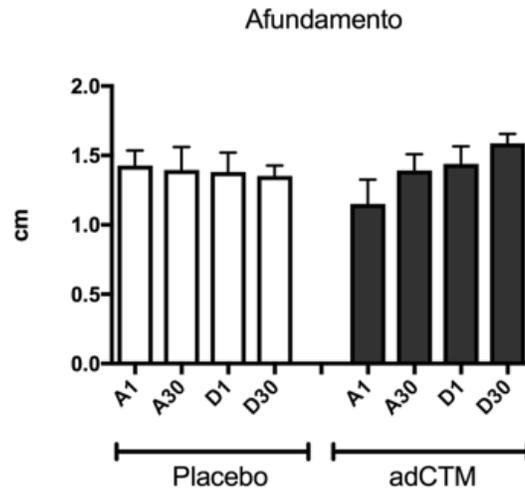


Figura 17: Valores médios e erros-padrão em centímetros (cm) obtidos pelo Metron Hoof-Pro na avaliação das medidas para afundamento em equinos com laminite crônica, antes (A1, 30) e depois (D1, D30) do tratamento nos grupos adCTM ou placebo por perfusão regional venosa.

4. DISCUSSÃO

Como parte do critério proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy* - ISCT), para serem classificadas como tronco, as CTMs devem ter a capacidade de diferenciação *in vitro* em tri-linhagem (osteoblastos, condroblastos e adipócitos) (Domicini et al., 2006; Bydlowsky et al., 2009), além da capacidade de se aderir a superfície plástica (Bydlowsky et al., 2009). O potencial de diferenciação dentro das várias linhagens mesenquimais é um componente integral do fenótipo das CTMs. O potencial de diferenciação em tri-linhagem só é possível mediante a uma adequada caracterização *in vitro* e o uso de ensaios fenotípicos apropriados para a diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica (Stewart & Stewart, 2011). Portanto os resultados encontrados neste trabalho confirmaram esse potencial para as adCTM usadas no tratamento.

A administração de adCTM por perfusão regional da veia digital palmar não induziu sinais clínicos relacionados a reações locais adversas. Tal fato deve estar relacionado ao uso de adCTM autólogas no presente estudo e a quantidade utilizada no tratamento foi de 2×10^7 células por membro infundido. Nossos achados corroboram com estudos prévios realizados com a mesma característica (Schnabel et al., 2013; Dryden et al., 2013; Morisson et al., 2014).

No presente estudo foi utilizado a venografia como forma de avaliar a perfusão digital de equinos com laminite crônica. Os modelos de perfusão vascular foram previamente usados para revelar defeitos de perfusão macroscópicos no dígito de equinos com laminite crônica comparados aos controles (Hood et al., 1994). O desenvolvimento de uma técnica de venografia digital no início dos anos 1990 demonstrou o enchimento retrógrado do sistema venoso digital seguinte à injeção de fluido de contraste radiopaco nas veias digitais e aplicação clínica potencial na posição do cavalo usando equipamento radiográfico padrão e um torniquete (Redden, 1993, Redden, 2001, Rucker, 2010^a; Baldwin & Pollitt, 2010, D'Arpe & Bernardini, 2010). A venografia digital ilustra as principais áreas de interesse, incluindo os vasos bulbares, vasos circunflexos, plexo coronário, vasos dorsais lamelares e arco terminal (Arthur & Rucker, 2003, D'Arpe & Bernardini, 2010). Em equinos saudáveis, a venografia digital revela vascularização distal consistente sem déficits de perfusão, incluindo o enchimento dos vasos venosos e enchimento arterial retrógrada em alguns casos (Redden, 2001, Rucker, 2003a, Rucker, 2003b, Arthur & Rucker, 2003; Rucker et al., 2006, Rucker, 2010c; D'Arpe & Bernardini, 2010). Em ambos casos de laminite crônica, induzida experimentalmente e de ocorrência natural, é possível observar venograficamente déficits de perfusão notáveis (Arthur & Rucker, 2003; Baldwin & Pollitt, 2010; D'Arpe & Bernardini, 2010; Rucker, 2010a).

Entretanto o uso da venografia exige acurácia técnica. Determinar diferenças nas alterações patológicas de variações no padrão vascular devido ao peso/rolamento ou a conformação do

casco podem ser difíceis para aqueles veterinários com experiência limitada que executem esta técnica. Embora, a técnica da venografia digital seja bem descrita (Redden, 2001; Redden, 2004; Rucker, 2010a; Rucker, 2010b) e achados comuns de equinos com laminite estejam bem relatados, não houve nenhum estudo em série de equinos com laminite crônica e tratados com adCTM, para avaliar as alterações promovidas por esta modalidade terapêutica. O presente estudo é o primeiro a relatar tais achados e os resultados demonstram algumas das variações no padrão vascular digital de equinos com laminite, observados durante as execuções das venografias digitais. Ainda, a técnica de venografia digital demonstrou-se eficaz, sendo possível avaliar os seis locais de maior interesse para avaliação da vasculatura digital em equinos. Os achados de exames venográficos verificados nestes animais antes de iniciar o tratamento foram classificados com graus entre médio e grave, apresentando lesões principalmente em vasos sublamelares dorsais, junção circunflexa-lamelar e ocasionalmente em plexo coronário. As mesmas características em equinos com laminite crônica já foi anteriormente descrita (D'Arpe & Bernardini, 2010; Rucker, 2017).

O escore de avaliação adaptado descrito por Leise et al. (2016) foi eficaz para avaliação dos animais deste estudo. O grupo tratado com adCTM obteve redução no grau de lesão em vasos dorsais sublamelares, junção circunflexa-lamelar e escore total quando comparados ao exame venográfico digital pré-tratamento. Tal resultado reforça a teoria de que a utilização das adCTM em equinos com laminite pode contribuir na melhora da perfusão vascular do estojo córneo atribuído principalmente ao seu potencial pró-angiogênico (Schnabel et al., 2009; Gugjoo & Sharma, 2018). O presente trabalho também indica que a administração intravenosa repetida de adCTM (cada animal recebeu três infusões de tratamento) não induziu efeitos locais indesejados. Além disso, a trombose capilar que pode ocorrer como consequência das injeções (Sole et al., 2012), não comprometeram a regeneração do leito vascular, como demonstrado pela venografia neste estudo. Outro fato constatado por essa metodologia de análise e nunca antes avaliado, foi que o membro administrado com solução placebo não apresentou melhora nas lesões vasculares. Este achado sugere a ineficácia da ação sistêmica das adCTM sobre a lesão de laminite neste grupo e baixa resposta fisiológica de reparo da lesão.

Durante a laminite crônica, o descolamento de tecido lamelar causa uma alteração na anatomia do estojo córneo. Como consequência, existe o comprometimento vascular com inflamação, edema e aumento da pressão. O déficit vascular, portanto, poderia ser uma consequência tanto do dano anatômico e do sofrimento e inflamação dos tecidos moles. Não se sabe exatamente qual o mecanismo pelo qual as adCTM contribuíram para a melhora de perfusão no presente estudo. Contudo, alguns autores sugerem que elas possam atuar controlando a inflamação, diminuindo a atividade biológica negativa de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a degradação da matriz de metaloproteinases (MMP), recrutando células-tronco locais e circulantes, reestabelecendo a integridade tecidual. Além disso, recentemente foi relatado que as adCTM equinas promovem a angiogênese *in vitro* por meio da secreção de vesículas de membrana, apoiando assim o potencial papel das adCTM como uma terapia para laminite equina em que a vascularização venosa e/ou arterial é comprometida (Caplan, 2009; Pascucci et al., 2014).

Em casos de laminite, o crescimento da muralha dorsal do estojo córneo é prejudicado, o que promove crescimento excessivo relativo nos talões. Flutuações na taxa de crescimento do estojo córneo criam uma aparência característica de anéis de crescimento. Estes anéis de crescimento, caminham paralelamente à banda coronária, divergem nos talões e convergem em região distal digital. O retardo de crescimento contínuo leva a uma aparência "abaulada" desta muralha dorsal, e se não for corrigida, a muralha se curvará e crescerá para cima, o que pode ser chamado de "Sapato de Aladim" (Pollitt, 2008; Eustace & Emery, 2009). Todas características anteriormente descritas com exceção da curvatura em muralha dorsal, foram observadas nos equinos do presente estudo. No entanto, a qualidade e o formato do estojo córneo dos membros tratados com adCTM melhoraram, assim como a mobilidade dos animais.

No presente estudo, a avaliação da taxa de crescimento com o implante de esferas metálicas na muralha dorsal do estojo córneo e a mensuração por meio do software Metron Hoof-Pro demonstrou-se uma metodologia eficaz. Não houve diferença significativa de crescimento do estojo córneo entre os membros torácicos direito e esquerdo durante o período de avaliação pré-tratamento, permitindo afirmar que não houve favorecimento na escolha dos membros para nenhum dos tratamentos.

No presente estudo, o crescimento linear do estojo córneo no grupo tratado com adCTM foi 20% maior quando comparado ao grupo placebo ao final do tratamento. O estojo córneo é formado por queratina e reveste a parte distal do dígito do equino, tendo como principais funções absorver impacto com o solo, resistência ao desgaste, auxílio na propulsão, no apoio e movimentação do animal além de propiciar o retorno sanguíneo da extremidade do membro locomotor. Seu desgaste ocorre de forma fisiológica com o uso e é continuamente substituído durante toda a vida do animal. O tecido queratinizado, que é produzido na zona de crescimento da faixa coronária, cresce em uma direção próximodistal (Pollitt, 2008). As partes dorsal, lateral, medial e do talão do estojo córneo crescem em diferentes velocidades, de acordo com a sua abrasão. Diferenças entre raças e indivíduos também devem ser consideradas. A parede dorsal cresce em torno de 0,4-0,8 cm por mês e é completamente substituída dentro de 12 meses, enquanto a substituição dos talões pode ser concluída em menos de quatro meses por causa de seu comprimento inferior (Wissdorf et al., 2002). Porém, algumas afecções podem alterar seu curso de crescimento, por exemplo a laminite (Pollitt & Collins, 2003; Pollitt, 2010), ocasionando um retardo em seu crescimento. Sabe-se que em equinos com laminite há uma perda significativa de células p63 positivas (marcador de células tronco epidérmicas) quando comparadas a equinos saudáveis (Carter et al., 2011), células estas consideradas de fundamental importância para a manutenção do crescimento do estojo córneo. Considerou-se que, devido ao potencial de diferenciação das adCTM, possa ter ocorrido o repovoamento desta destas células tronco epidérmicas, o que explicaria o aumento do crescimento do estojo córneo após o tratamento. Ainda o potencial pró-angiogênico do tratamento descrito anteriormente pode também ter contribuído para este resultado.

Sobre a relação espacial entre a falange distal e o estojo córneo, efeitos positivos também foram verificados nos membros tratados com adCTM. Para o ângulo de falange foi observado um aumento significativo no grupo placebo em D30 e ainda diferença entre grupos no tempo D30, demonstrando o efeito positivo na posição da falange distal e maior estabilidade na relação espacial entre a falange distal e o estojo córneo no grupo adCTM. No ângulo de rotação houve diferença significativa entre os grupos no tempo D1, demonstrando que o grupo adCTM iniciou a terapia em pior condição comparado ao grupo placebo. Apesar de não ter sido verificado diferença estatística no tempo D30, houve uma redução deste ângulo ao término do tratamento no grupo adCTM, redução esta não observada no grupo placebo. Este resultado corrobora com o resultado encontrado para ângulo de casco, confirmando a estabilidade de falange distal verificada no grupo adCTM.

O ângulo palmar foi significativamente maior em ambos os grupos adCTM e placebo no tempo A30 comparado a A1, resultado este refletido pela evolução da laminite com aumento do ângulo de rotação durante o período sem tratamento. Ainda houve diferença significativa entre os grupos adCTM e placebo nos tempos A30 e D30. O aumento do ângulo palmar pode ser correlacionado ao aumento da rotação falangeana, porém não foi evidenciado o aumento de rotação no grupo adCTM ao final do tratamento. Com base nesta informação, a diferença verificada entre os grupos para o ângulo palmar após o tratamento foi correlacionada a um maior crescimento de talões no grupo adCTM comparado ao grupo placebo. Estes resultados indicam os benefícios da terapia com as adCTM através de sua contribuição para o restabelecimento da arquitetura de tecidos danificados, mas também pela sua capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora potente, promovendo interação célula-célula e ou liberação de fatores solúveis no ambiente local. Ainda possuem um perfil ou imunofenotipagem distinta de fatores bioativos tróficos, mediadores inflamatórios e moléculas de adesão que atuam inibindo a formação da cicatrização e apoptose, aumentam angiogênese e estimulam células progenitoras intrínsecas para levar ao retorno da homeostase do tecido (Caplan, 2009; Monteiro et al., 2010).

A distância proximal encontrada entre o estojo córneo e a falange dos equinos com laminite crônica no presente estudo foi significativamente maior no tempo A30 comparado ao A1 no grupo adCTM ($P < 0,05$), e a distância distal entre estojo córneo e falange foi significativamente maior em ambos os grupos placebo e adCTM no tempo A30 comparado a A1. Estes resultados demonstram que durante todo o período em que não houve tratamento a falange distal se manteve estável, também confirmados pelos resultados de ângulo de rotação durante este mesmo período em que não houve rotação significativa.

Embora existam pesquisas demonstrando o efeito sistêmico das adCTM em animais experimentais de pequeno porte (Gonçalves et al., 2018; Monteiro et al., 2018; Oliveira et al., 2018), este efeito não foi verificado no presente estudo. Não houve diferença significativa nos achados venográficos, no crescimento do estojo córneo e na relação espacial falange/estojo córneo. Sendo assim, não foi possível observar o efeito terapêutico sistêmico hipotetizado promovido pelas adCTM. Especula-se que estes resultados possam estar

relacionados à quantidade de células aplicadas localmente, considerado a proporção células/volume sanguíneo total ineficaz sistemicamente para a espécie equina.

As limitações do presente estudo foram o baixo número de casos envolvidos, a ausência de dados moleculares mais específicos sobre os resultados adquiridos e o curto tempo de observação da evolução dos animais pós-tratamento. Tais fatores impedem que os resultados sejam generalizados e que se estabeleça uma relação definitiva causa/efeito clara entre o tratamento com adCTM e a melhora da laminite. Contudo nosso estudo demonstra que a medicina regenerativa pode ser mais explorada no tratamento da laminite crônica.

5. CONCLUSÃO

De acordo com a hipótese levantada verificou-se que a aplicação das adCTM por perfusão regional promoveu melhorias na perfusão vascular verificadas por meio da venografia, na taxa de crescimento do casco e na relação espacial entre casco/falange distal. Entretanto, contrariando a segunda parte da hipótese, esse efeito só foi comprovado no membro tratado com adCTM.

Os achados deste estudo demonstraram que o protocolo de três aplicações, a cada 15 dias, de 2×10^7 por via intravenosa por perfusão regional no dígito de equinos com laminite crônica estável promove melhorias apenas no casco tratado, sendo necessário a repetição do tratamento nos outros membros acometidos.

6. REFERÊNCIAS

ARTHUR E, RUCKER A. The Use of Digital Venography for Assessment of Perfusion Deficits in Chronic Laminitis. Missouri. (s.d.). 2003.

BALDWIN G, POLLITT C. Progression of venographic changes after experimentally induced laminitis. Vet. Clin. N. Am., p. 135-140, 2010.

CARTER RA, ENGILES JB, MEGEE SO, SENOO M, GALANTINO-HOMER HL. Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. Eq. Vet. J., v. 43, p. 543-551, 2011.

CAPLAN AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. The J. of Path., V. 217, p. 318-324, 2009.

D'ARPE L, BERNARDINI D. Digital Venography in Horses and Its Clinical Application in Europe. Vet. Clin. N. Am. Eq. Prac., v. 26, p. 339-359, 2010.

- DE SCHAUWER C, MEYER E, VAN DE WALLE GR, VAN SOOM A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Ther.*, V.75, p. 1431-1443, 2011.
- DRYDEN VC, MORRISON S, BRAS R, MORRELL SA. Using stem cells in clinical cases. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, p. 872-873, 2013.
- EADES SC. Overview of what we know about the pathophysiology of laminitis. *J. Eq. Vet. Sci.*, v. 30, p. 83-86, 2010. (b).
- EASTMAN S, REDDEN RF, WILLIAMS CA. Venograms for use in laminitis treatment. *J. Eq. Vet. Sci.*, v. 32, P757-759, 2012.
- EUSTACE RA, EMERY SL. Case Report: Partial coronary epidermectomy (coronary peel), dorsodistal wall fenestration and deep digital flexor tenotomy to treat severe acute founder in a Connemara pony. *Eq. Vet. Ed.*, v. 2, p. 91-99, 2009.
- GUGJOO, MB, SHARMA, GT. Equine mesenchymal stem cells: properties, sources, characterization and potential therapeutic applications. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 72, p. 16-27, 2018.
- HOOD DM, GROSENBAUGH DA, SLATER MR. Vascular perfusion in horses with chronic laminitis. *Eq. Vet. J.*, v. 26, p. 191-196, 1994.
- LEISE B, MILLER N, MOORMAN V, BASS L, PITTMAN S, RUCKER A, REDDEN RF. Assessment of digital venograms in non-laminitic horses. *American Association of Equine Practitioners (AAEP)*. p. 297, 2016.
- MORRISON S, DRYDEN VC, BRAS R, MORRELL S. How to use stem cells in clinical laminitis cases. In *Proceedings of the 60th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Salt Lake City, Utah, USA, p.499-503. *American Association of Equine Practitioners (AAEP)*, 2014.
- NOSCHKA E, VANDENPLAS ML, HURLEY DJ, MOORE JN. Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 15, p.242-53, 2009.
- PASCUCCI L, ALESSANDRI G, DALL'AGLIO C, MERCATI F, COLIOLO P, BAZZUCCHI C, DANTE S, PETRINI S, CURINA G, CECCARELLI P. Membrane vesicles mediate pro-angiogenic activity of equine adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. J.*, v. 202, p. 361-366, 2014.
- POLLITT CC. *Advances in Laminitis, Part I, An Issue of Veterinary Clinics: Equine Practice*. Queensland: Elsevier Inc. 2010.
- POLLITT CC, VISSER MB. Carbohydrate Alimentary Overload Laminitis. *Vet Clin. Eq.*, v.26, p. 65-78, 2010.
- POLLITT CC. *Equine laminitis – Current concepts*. Canberra (Australia): Rural Industries Research and Development Corporation. p. 116, 2008.

- POLLITT CC, COLLINS SN. Chronic laminitis. In: Ross M, Dyson SJ, editor. Lameness in the horse. 2nd edition, in press, 2003.
- REDDEN RF. Preventing laminitis in the contralateral limb of horses with non-weightbearing lameness. Clin. Tech. Eq. Pract., v. 3, p. 57-63, 2004.
- REDDEN RF. A technique for performing digital venography in the standing horse. Eq. Vet. Edu., v. 3, p. 172-178, 2001.
- REDDEN, RF. The Use of Venograms as a Diagnostic Tool. Proceedings of the 7th Bluegrass Laminitis Symposium, 1993, Kentucky, Usa, p. 1-6,1993.
- RUCKER, A. The Digital Venogram. Em J. K. Belknap, Equine Laminitis. Iowa: Wiley Blackwell, p. 240-251, 2017.
- RUCKER, A. Chronic laminitis: strategic hoof wall resection. Vet. Clin. N. Am. Eq. Prac., v. 26, p. 197-205, 2010.
- RUCKER A. Clinical application of digital venography. J. Eq. Vet. Sci., v. 30, p. 491-503, 2010 (a).
- RUCKER A. Equine venography and its clinical application in North America. Vet. Clin. North Am. Eq. Pract., v. 26, p. 167-177, 2010 (b).
- RUCKER, A. Equine Venography and Its Clinical Application in North America. Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract., v. 26, p. 167-77, 2010 (c).
- RUCKER, A, REDDEN, RF, ARTHUR, EG, REED, SK, HILL, BW, DZIUBAN, EM, RENFRO, DC. How to Perform the Digital Venogram. 52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2006, Texas, Usa, p. 526-530, 2006
- RUCKER, A. Interpreting Venograms: Normal or Abnormal and Artifacts That May Be Misinterpreted. 16th Bluegrass Laminitis Symposium, 2003, Kentucky, Usa, p. 97-101, 2003 (a).
- RUCKER, A. Key Points of the digital venogram. 16th Bluegrass Laminitis Symposium, 2003, Kentucky, Usa, p. 105-109, 2003 (b).
- SCHNABEL LV, FORTIER LA, McLLWRAITH CN, NOBERT KM. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? The Vet. J., v. 197, p. 570-577, 2013.
- SCHNABEL LV, LYNCH ME, VAN DER MEULEN MC, YEAGER AE, KORNATOWSKI MA, NIXON AJ. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. J. Orth. Res., v. 27, 1392-1398, 2009.
- SOLE A, SPRIET M, GALUPPO LD, PADGETT KA, BORJESSON DL, WISNER ER, STEWART, MC, STEWART, AA. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, sources, and mechanisms of action. Vet. Clin. North Am. Equine Pract., v.27, p.243–261, 2011.

THRALL DE. Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology. 4th ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 2002.

WYLIE CE, COLLINS SN, VERHEYEN KL, NEWTON JR. Frequency of equine laminitis: A systematic review with quality appraisal of published evidence. Vet. J., v. 3, p. 248-256, 2011.

WISSDORF H, GERHARDS H, HUSKAMP B, DEEGEN E. Praxisorientierte anatomie und propädeutik des pferde. Hannover (GER): M & H Schaper. p. 944, 2002.

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LAMELAS DO ESTOJO CÓRNEO DE EQUINOS COM LAMINITE

RESUMO

Objetivou-se verificar os efeitos da perfusão regional venosa com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (adCTM) sobre o tecido lamelar de equinos com laminite. Seis éguas com laminite crônica estável, tratadas com protocolo padrão de realinhamento da falange distal no casco, foram submetidas a perfusões regionais da veia digital com adCTM previamente caracterizadas (20 milhões de células, 3 perfusões quinzenais) e placebo no membro contralateral. Biópsias do tecido lamelar dorsal foram coletadas usando o lamelótomo de Falcão-Faleiros 30 dias antes e 15 dias após o final dos tratamentos. Cada amostra foi classificada (sistema crescente de escore de 0 a 5) de acordo com o grau de lesão histológica. No grupo placebo, observou-se aumento do grau de lesão histológica global ($P=0,01$) em relação ao basal no grupo placebo, com ênfase para perda do eixo queratinizado ($P=0,0001$), hiperplasia de estrato médio ($P=0,001$), perda de homogeneidade das lamelas epidérmicas primárias ($P=0,003$) e o grau de hiperqueratose ($P=0,05$). Com exceção de hiperplasia lamelar ($P=0,05$), não se observou qualquer aumento estatístico nos graus de lesão histológica nos membros tratados com adCTM. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos no pré-tratamento, entretanto diferenças significativas entre os grupos adCTM e placebo foram observadas no pós-tratamento para o escore de lesão global ($P\leq 0,05$), com destaque para a variável ausência de eixo queratinizado ($P\leq 0,01$). Conclui-se que a infusão regional venosa de adCTM preveniu a progressão da maioria das lesões histológicas no membro infundido, fato não comprovado no membro contralateral. Os achados confirmam o potencial terapêutico da adCTM no tratamento de equinos em estágio inicial de laminite crônica, demonstrando a necessidade de infusão regional em todos dos membros afetados.

Palavras chave: Equino, laminite, histologia, terapia celular.

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the effects of venous regional perfusion with mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (adMSC) on the lamellar tissue of horses with laminitis. Six mares with stable chronic laminitis, treated with a standard protocol for realignment of the distal phalanx in the hull, underwent regional perfusion of the digital vein with previously characterized adMSC (20 million cells, 3 bi-weekly infusions) and placebo

in the contralateral limb. Dorsal lamellar tissue biopsies were collected using the Lamelótomo Falcão-Faleiros 30 days before and 15 days after the end of treatments. Each sample was classified (increasing system of score from 0 to 5) according to the degree of histological lesion. In the placebo group, there was an increase in the degree of global histological lesion ($P=0.01$) from baseline in the placebo group, with emphasis on keratinized axis loss ($P=0.0001$), medium stratum hyperplasia ($P=0.001$), loss of homogeneity of primary epidermal lamellae ($P=0.003$) and degree of hyperkeratosis ($P=0.05$). With the exception of lamellar hyperplasia ($P=0.05$), no statistical increase in degrees of histological lesion was observed in limbs treated with adMSC. There were no statistical differences between the pre-treatment groups, however significant differences between the adMSC and placebo groups were observed in the post-treatment for the global lesion score ($P\leq 0.05$), with emphasis on the absence of keratinized axis ($P\leq 0.01$). It was concluded that regional venous infusion of adMSC prevented the progression of most histological lesions in the infused limb, a fact not proven in the contralateral limb. The findings confirm the therapeutic potential of adMSC in the treatment of horses in the early stage of chronic laminitis, demonstrating the need for regional infusion in all affected limbs.

Key words: Equine, laminitis, histology, cell therapy.

1. INTRODUÇÃO

A parede do estojo córneo equino é formada pelas camadas externa, média e interna. A camada interna também pode ser chamada de camada lamelar devido à presença de lamelas dérmicas e epidérmicas, que se entrelaçam sustentando a falange distal dentro do estojo córneo desta camada na parede do estojo córneo (Pollitt, 2004). As lamelas epidérmicas primárias são maiores e queratinizadas, e dão origem a lamelas epidérmicas secundárias, que são menores e não queratinizadas (Pollitt 1992, Burg et al., 2007). Essas lamelas interpõem com as lamelas dérmicas, primárias e secundárias, e formam a arquitetura da junção lamelar (Pollitt, 2008).

A junção lamelar tem a função de sustentação entre a falange distal e a parede do estojo córneo. Desta forma, a transferência de força entre o solo e o esqueleto apendicular ocorre via parede do estojo córneo e junção lamelar (Thomason et al., 2005), contribuindo na redução do estresse e garantindo melhor distribuição de impacto no solo (Pollitt et al., 2004). Entre as lamelas epidérmica e dérmica existe a membrana basal, uma fina camada de colágeno fibrilar e a glicoproteína laminina. Uma única fileira de células basais reveste as lamelas epidérmicas secundárias às quais a membrana basal é firmemente aderida. As lamelas epidérmicas secundárias possuem como características anatômicas extremidades arredondadas, núcleos das células basais elípticos posicionados do lado oposto à membrana

basal e a membrana basal firmemente unida a estas células. O tecido conjuntivo dérmico preenche os espaços entre as lamelas secundárias sem formar lacunas (Pollitt, 2008).

As colorações de hematoxilina e eosina (HE) ou ácido periódico de Schiff (PAS) podem ser usadas para demonstrar as lamelas epidérmicas e a membrana basal em cortes histológicos, enquanto os hemidesmossomas são melhor observados por meio de investigação por microscopia eletrônica (Pollitt, 2008).

Inicialmente, em equinos com laminite, as células basais das lamelas epidérmicas secundárias perdem sua ligação intercelular e parecem deslizar umas sobre as outras. Seus núcleos celulares tornam-se arredondados e se deslocam para a membrana basal. As lamelas secundárias têm uma aparência esticada e uma ponta afilada. Nessas pontas cônicas, a membrana basal começa a se separar das células basais subjacentes, possibilitadas pela degradação da laminina. Essas alterações podem ser detectadas no final da fase de desenvolvimento da laminite equina, antes do início dos sintomas clínicos e caracterizar laminite histológica de grau 1. A laminite histológica de grau 2 é definida por uma retração da membrana basal. As lamelas dérmicas e epidérmicas se afastam umas das outras, resultando na formação de aglomerados amorfos de células epidérmicas. A separação rápida e completa da membrana basal de todas as lamelas epidérmicas que circundam a falange distal leva à sua separação total do estojo córneo e a falange distal afunda distalmente. Este pior cenário é referido como laminite histológica de grau 3 (Pollitt, 2008).

O exame por microscopia eletrônica das seções lamelares retiradas de equinos com laminite mostrou um número reduzido de hemidesmossomos em comparação com amostras de equinos saudáveis. Pollitt (2008) suspeitou de uma correlação entre sua densidade e a gravidade da manifestação da doença. Outras alterações histológicas ocorridas durante os estágios iniciais da laminite equina são: formação de edema no espaço extravascular, que provavelmente comprime os capilares e pequenas artérias entre e próximo às lamelas epidérmicas secundárias; trombose microvascular; infiltração de leucócitos; e mitose e apoptose das células basais epidérmicas (Weiss et al., 1994; White, 2005; de Laat et al., 2011; Faleiros et al., 2011a).

Equinos com laminite crônica desenvolvem o descolamento da interface dermoepidérmica e podem exibir várias formas de deslocamento do esqueleto apendicular (Morrison, 2010). A cicatrização desse tecido danificado é, em grande parte, através da hiperplasia de células epidérmicas lamelares, ou a formação de cunha lamelar (Hood, 1999; Grosenbaugh et al., 1999), e a estabilidade da interface lamelar é inversamente relacionada com a espessura da cunha lamelar (Kuwano et al., 2002; Collins et al., 2010).

Entretanto, apesar dos grandes esforços, muitos casos de laminite crônica se estabilizam com tecido lamelar de baixa qualidade ou são tão instáveis que a eutanásia é recomendada. A terapia com células tronco mesenquimais (CTMs) é uma opção de tratamento promissora porque pode influenciar positivamente a qualidade do tecido na reparação da lesão. Estudos mostraram que a terapia com CTMs influenciou positivamente a cicatrização de várias lesões ortopédicas (Lacitignola et al., 2008; Smith, 2008; Watts et al.,

2011; Caniglia et al., 2012; Ferris et al., 2012; Garbin et al., 2019). Além disso, a terapia com CTMs tem efeitos anti-inflamatórios que podem correlacionar com uma resposta paliativa observada após o tratamento (Peroni & Borjesson, 2011).

A manutenção e reparação de tecidos epiteliais estratificados baseiam-se na presença de células progenitoras epiteliais, incluindo células-tronco epiteliais (CTE), as células amplificadoras de trânsito (CAT), e a diferenciação apropriada de CAT para o tipo terminal celular. Estudos anteriores demonstraram que as lamelas epidérmicas displásicas em equinos com laminite crônica têm expressão significativamente diminuída de p63, um marcador de capacidade proliferativa de CTE, compatível com o crescimento alterado, diferenciação e capacidade regenerativa desse tecido (Blanpain & Fuchs, et al., 2009; Carter et al., 2011). Outros estudos demonstraram a supressão da via de sinalização Wnt canônica no tecido lamelar de equinos com laminite e alterações associadas na expressão epidermal de células e proteínas de adesão célula-matriz, que também é consistente com diferenciação celular e tecidual alterada (Senoo et al., 2007; Carter et al., 2011).

Mediante ao que foi descrito anteriormente, e devido não haver estudos publicados sobre o efeito da terapia com células tronco derivadas de tecido adiposo (adCTM) na cicatrização lamelar, faz-se necessário uma melhor compreensão da morfofisiologia da junção lamelar de equinos com laminite e a influência desta terapia sobre o mecanismo de reparação tecidual. Assim, os objetivos foram descrever os achados histopatológicos de equinos com laminite crônica e classificar o grau de lesão pré e pós-tratamento com adCTM ou placebo; avaliar a histomorfometria lamelar epidermal pré e pós-tratamento com adCTM ou placebo; testar o protocolo imunohistoquímico para o anticorpo p63 (células epiteliais progenitoras) em amostras lamelares de equinos saudáveis e com laminite crônica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção e Descrição de Casos Clínicos

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais de cuidados e uso de animais (CEUA/UFMG 282/2016). Foram utilizados seis equinos, Mangalarga Marchador, fêmeas não gestantes, com peso entre 381 ± 11 kg, com idade média de $8,3 \pm 4,7$ anos e escore corporal 6 ± 1 (escore 1 a 9). Estes animais foram atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, e identificados como portadores de laminite crônica por meio do histórico, e confirmados através de exame físico e radiológico. Foram selecionados animais que apresentaram histórico de laminite por ingestão de excesso de carboidratos e com tempo de afecção em torno de 10-15 dias, com sinais de claudicação equivalentes aos graus de Obel de 1 a 2 (Obel, 1948). A claudicação

foi avaliada em todos os equinos subjetivamente por dois veterinários. Radiografias bilaterais em membros torácicos e venografias digitais foram realizadas em todos os equinos. Também foram realizadas projeções digitais lateromedial e dorsoplantar dos membros pélvicos em todos os animais. Os equinos com rotação de falange superior a 10 graus e/ou com perfuração de sola foram descartados para este estudo. Os animais foram mantidos estabulados em baias individuais no setor de Cirurgia de Grandes Animais da Escola de Veterinária, com acesso à água e feno ad libitum e receberam 1% do seu peso corporal vivo de ração comercial Guabi Proequi Original (Nutriage – Guabi S. A., Além Paraíba, Minas Gerais) distribuído em duas administrações diárias até a finalização do estudo.

2.2 Avaliação da claudicação

Todos os seis animais foram avaliados para claudicação por 2 veterinários. Os cavalos foram avaliados subjetivamente na caminhada/trote em linha reta em piso duro. Os animais com claudicação equivalente a graus de Obel 3 e 4 não foram utilizados neste estudo. Em todos os animais com grau 1 a 2 de claudicação foram realizados bloqueios perineurais em sesamóide abaxial para confirmar se a origem da claudicação era no estojo córneo.

2.3 Período de observação e tratamento inicial

Os animais admitidos passaram por um período de observação de 30 dias antes da aplicação das adCTM. Para tanto, realizou-se casqueamento corretivo e redistribuição de contato do casco com o solo por meio da colocação de tamancos de madeira e preenchimento da ranilha e sola com silicone de condensação a base de polidimetilsiloxano (Speedex Putty, (Coltene/Vigodent AS Indústria e Comércio) de acordo com protocolo de atendimento do serviço de Clínica Cirúrgica de Grandes Animais do Hospital Veterinário da UFMG. Logo após o casqueamento, aqueles animais que ainda apresentaram desconforto foram tratados por um período de até uma semana com fenilbutazona (4,4 mg/kg SID). Estes procedimentos objetivaram melhorar a condição algica, impedir a progressão da rotação e proporcionar maior conforto aos animais, padronizando a terapia biomecânica durante até no máximo uma semana.

Assim, antes do início do estudo todos os animais foram considerados portadores de laminite crônica estável. A partir deste momento nenhum outro medicamento foi utilizado até a finalização do estudo.

A cronologia de realização de todas as etapas do experimento está descrita conforme a Figura 1.

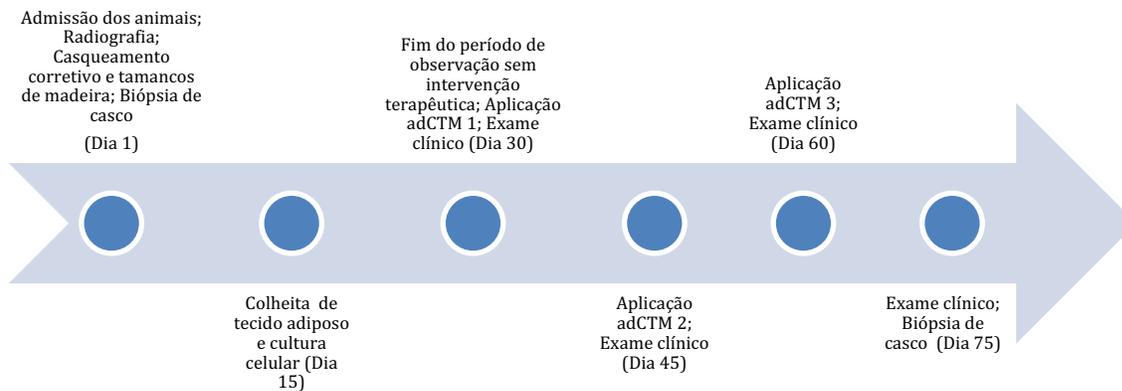


Figura 1: Cronologia de realização do experimento.

2.4 Colheita de tecido adiposo e cultura celular

Quinze dias após a admissão no experimento, foi colhida uma amostra de tecido adiposo de cada equino. Antecedendo a colheita, o animal foi mantido em jejum alimentar de 12 horas, submetido a sedação com xilazina 10% (0,7 mg/kg/IV), observado quanto ao comportamento, sendo considerado a sedação adequada quando animal estivesse com a cabeça abaixo da altura da escápula. Neste momento realizou-se tricotomia na região acima do músculo glúteo dorsal, na base da cauda, antissepsia e anestesia local utilizando bloqueio em L invertido próximo a esta região (local de coleta de tecido adiposo) e a avaliação da dor foi realizada observando-se a resposta do animal aos estímulos dolorosos. Foi realizado uma incisão de aproximadamente 4-5 cm de comprimento paralelamente a cauda permitindo a visualização de uma camada de tecido adiposo entre a pele e a musculatura. Após dissecação do tecido subcutâneo, foram coletadas amostras de tecido adiposo de aproximadamente 1,0 cm³ (2,0 gramas), e armazenadas em tubo falcon estéril de 50,0 mL contendo meio de cultura celular. A pele foi suturada com nylon 2/0 em padrão simples separado. As amostras foram encaminhadas imediatamente para processamento em laboratório de cultura.

Em capela de fluxo laminar, esse tecido foi submetido a lavagens sucessivas com PBS, cortados em pequenos pedaços e transferidos para outro tubo falcon de 15,0 mL contendo solução de colagenase do tipo I (Sigma, St Louis MO, USA) para ação digestiva, por 60 minutos, em estufa a 37°C, 5% de CO₂, agitado a cada 15 minutos. Posteriormente, o tubo

foi centrifugado a 694G (2000 rpm) durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 10,0 ml de PBS, sendo centrifugado novamente. Após esta etapa o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 10,0 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) acrescido de SFB (Soro Fetal Bovino).

Uma alíquota deste volume foi utilizada para contagem celular em câmara de Newbauer. Logo após as células foram semeadas em garrafas de 75 cm² com densidade de 27×10^3 por cm² e incubadas em meio de crescimento básico contendo DMEM (baixa glicose) suplementadas com 10% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina e 0,1% de anfotericina (DMEM completo) à 37° C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. Esta fase de crescimento celular inicial foi chamada de passagem 0 (P0). Aproximadamente 96-120 horas, foram identificadas células aderentes agrupadas em nichos, as células não aderentes foram descartadas e o meio de cultura trocado. As células foram monitoradas diariamente, em microscópio invertido de contraste de fase, sendo o meio de cultura trocado a cada dois/três dias, de acordo com o metabolismo celular, avaliados por meio da morfologia das células, confluência da cultura e características físicas do meio de cultura.

As células permaneceram em estufa, até a confluência de 80%. Após esta característica ser identificada o meio de cultura foi totalmente desprezado e a cultura foi tripsinizada (Tripsina-EDTA 1x) e incubada a 37° C, durante 5 minutos. Após esse período, a ação da tripsina foi inativada com acréscimo de meio DMEM completo. A solução foi transferida para um tubo de centrífuga e centrifugada à temperatura de 22° C e 694G (2000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente desprezado e o pellet celular (P1) ressuspenso em meio DMEM completo, e novamente dividido em garrafas de cultura, mantendo a mesma densidade celular anteriormente informada. A cada nova confluência de 80% o procedimento foi repetido até atingir a quarta passagem celular (P4).

2.4.1. Diferenciação celular

As CTMs foram diferenciadas em tri-linhagem (adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas) para demonstrar sua multipotencialidade, de acordo com os requisitos estabelecidos para garantir a caracterização de CTMs de equinos (De Schauwer et al., 2011). Todas as diferenciações foram realizadas em triplicata e uma amostra foi mantida em meio basal (células controle) durante 14 dias (adipogênica e osteogênica) e 21 dias (condrogênica).

Para diferenciação adipogênica, as células P3 foram plaqueadas a 20.000 células / cm² em placas de 6 poços e cultivadas sob condições adipogênicas por 14 dias. O meio (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, EUA) foi trocado a cada 3 dias, as células foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 10 minutos, enxaguadas com PBS e coradas com *Oil Red O* (Gibco, Grand Island, NY, EUA) de acordo com fabricante.

Para realizar a caracterização osteogênica de adCTM, as células P4 foram plaqueadas a 20.000 células / cm² em placas de 6 poços e cultivadas em condições osteogênicas por 14 dias, o meio (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, EUA) foi trocado a cada 3 dias, as células foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 10 minutos, enxaguadas com água estéril e coradas com Vermelho de Alizarina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) de acordo com fabricante.

Para diferenciação condrogênica, as células P4 foram plaqueadas a 20.000 células / cm² em placas de 6 poços e cultivadas em condições condrogênicas por 21 dias. O meio STEMPRO® (Gibco, Grand Island, NY, EUA) foi usado para diferenciação condrogênica e foi trocado a cada 3 dias. As células foram fixadas com formalina tamponada a 10% durante 10 minutos. Para detectar a diferenciação condrogênica, as células foram coradas com *Alcian Blue* em pH 2,5.

2.4.2. Aplicação e preparo das células para infusão em solução NaCl 0,9%

Após a terceira passagem, outras amostras de células foram tripsinizadas (P4), observadas em microscopia óptica para a avaliação da viabilidade celular, submetidas a contagem em câmara de Neubauer e alíquotadas na concentração de 2×10^7 células/ 3 ml de PBS (Spriet et al., 2013). Cada alíquota foi armazenada em seringa de 20 ml, sendo utilizada solução fisiológica NaCl 0,9% para completar o volume da seringa. Após isso, foi transportada para o centro cirúrgico, aguardando o momento da aplicação. Todas as etapas de cultivo celular foram repetidas por mais duas vezes, totalizando três aplicações com intervalos de 15 dias entre as mesmas. Em um membro torácico foi aplicado o tratamento celular (adCTM) e o outro apenas solução fisiológica NaCl 0,9% (solução placebo) no mesmo volume de aplicação. A decisão sobre qual seria o membro tratado e o membro placebo foi tomada por sorteio.

2.5 Biópsia do estojo córneo

As biópsias do estojo córneo foram realizadas em dois momentos distintos, na primeira semana de inclusão do animal no estudo (pré-tratamento) e quinze dias ao final do tratamento com a adCTM ou placebo (pós-tratamento). As amostras foram colhidas nos membros torácicos esquerdo e direito (Ribeiro et al., 2017). As amostras iniciais foram obtidas na muralha dorsal, dois centímetros abaixo da linha da coroa. Na segunda colheita, as amostras

foram obtidas no mesmo local, sempre de forma proximal à biópsia inicial, e de forma a obter amostras do tecido crescido após o tratamento.

Para a realização dessas biópsias, os animais foram sedados com xilazina 10% (0,7 mg/kg peso vivo IV) e os cascos foram dessensibilizados através anestesia perineural (lidocaína 2%, sem vasoconstritor, 5 ml em cada nervo palmar e metacárpico mediais e laterais. Para obtenção das biópsias, foi realizado o desgaste da muralha do casco na superfície dorsal, retirando-se a porção queratinizada num formato retangular com o auxílio de uma máquina elétrica do tipo mini retífica (Retifica Dremel Série 4000 Profissional 175W). Em seguida, cortes com lâmina de bisturi nº 24 foram realizados contornando o retângulo já existente, penetrando até a falange distal. Logo após um fragmento do tecido lamelar do casco (0,5 x 3 cm) foi extraído com o auxílio do lamelótomo de Falcão-Faleiros (grupo de pesquisa Equinova/EV-UFGM). As perfurações foram vedadas com polimetilmetacrilato (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, Ltda) (Figura 2).



Figura 2: Sequência fotográfica de procedimentos de biópsia lamelar com o lamelótomo de Falcão-Faleiros mostrando a demarcação do local da biópsia (A), o desgaste do tecido queratinizado com um cortador plano ligado a uma ferramenta elétrica rotativa (B), a incisão das margens internas com um bisturi (C-D), a inserção e o avanço do lamelótomo (E). Amostra obtida (F).

2.6 Classificação histopatológica lamelar e histomorfometria

Logo após as colheitas, as amostras foram divididas e acondicionadas respeitando as técnicas utilizadas para cada análise. Para o exame histopatológico, as amostras foram acondicionadas em frascos contendo formol salino tamponado a 10% durante 72 horas, sendo depois transferidas para frascos contendo álcool 70%, até o processamento, ou seja, incluídas em parafina histológica, cortadas a 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Shiffer (PAS).

As seções lamelares de HE e PAS foram avaliadas e categorizadas por dois avaliadores cegos ao estudo com base nos seguintes critérios previamente estabelecidos (Carter et al., 2011): ausência de LEP (LEP Au); falta de homogeneidade lamelar epidermal (LEP Homo); grau de encurtamento, distorção ou afilamento das lamelas epidérmicas primárias (LEP Dist); presença de hiperplasia do extrato médio (Hip Est Med); hiperqueratose (Hiperquer); presença do eixo queratinizado com ou sem fusão adjacente (Eixo Querat); colapso de LES (Colapso LES); tipo e grau de patologia da membrana basal (separação, divisão e ausência) (MB lesão); ilhas epidérmicas isoladas queratinizadas (Ilhas Isol); hiperqueratinização ao redor de túbulos em extrato médio (Hiper Tubul). Cada uma destas lesões foi graduada por meio de escore sendo ausente (0), leve (1), moderado (2) e intenso (3). Posteriormente, o valor de escore para cada uma destas variáveis foi somada para se obter o valor global do indivíduo relativo aquela biópsia. As seções de PAS foram utilizadas para morfometria lamelar.

As lâminas foram escaneadas e digitalizadas pelo Scanner de Lâminas no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (ICB/UFGM) por meio do Scanner de lâminas 3D Histech (3D Histech, Budapeste, Hungria). As imagens foram visualizadas utilizando o software Pannoramic Viewer (3D Histech, Budapeste, Hungria), com uma ampliação de 40 vezes em um período de amostragem espacial de 0,2 m por pixel (Faleiros et al., 2011b). O comprimento total das lâminas epidermais foi realizada pelo software Pannoramic Viewer (3D Histech, Budapeste, Hungria), com aumento de 20x, medindo o comprimento total de 5 lamelas epidermais por lâmina.

2.7 Imunohistoquímica para p63

Com objetivo de padronizar a técnica para uso em animais com laminite, inicialmente testou-se o protocolo em um equino controle, ou seja, clinicamente saudável.

Para avaliar as células progenitoras, cortes dos tecidos lamelares foram destinados à análise imunohistoquímica para o anticorpo p63 (D9L7L) da empresa Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). As amostras foram processadas em parafina, cortadas a 3 µm de espessura e fixados em lâminas polarizadas e previamente preparadas com Poly-L-Lisina, e submetidos ao protocolo adaptado conforme indicado pelo fabricante (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a seguir: colocou-se as lâminas em solução de Citrisolv e

incubou à temperatura ambiente por 5 minutos. Após, foi removido o Citrisolv e repetido o passo anterior por mais 5 minutos. Adicionou-se 50-60 ml das seguintes soluções em cubas de vidro: etanol 100%, etanol 95%, água destilada, PBS (pH 7,4), H₂O₂ 3%. Foram executados os seguintes passos de lavagem com etanol: etanol 100% (10 minutos); etanol 100% (10 minutos); etanol 95% (10 minutos); etanol 95% (10 minutos). Após as lâminas foram colocadas na cuba de vidro com água destilada por 5 minutos. Foi repetido o procedimento anterior por mais 5 minutos. Em seguida foi realizado a recuperação do antigênica conforme descrito pelo fabricante (as lâminas foram aquecidas em solução de desintoxicação de citrato 1x). Para preparar 300 ml de solução de citrato (1x) adicionou 30 ml de solução de citrato (10x) a 270 ml de água destilada. Deixou-se as lâminas no banho de citrato (1x) e manteve-se a uma temperatura de ebulição de 95° C. Após esfriar as lâminas em uma bancada por 30 minutos, lavou-se as lâminas em água destilada três vezes durante 5 minutos cada. As lâminas foram mergulhadas em peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos. Após lavou-se em água destilada duas vezes por 5 minutos cada. Lavou-se os cortes em solução tampão (TBST 1X) por 5 minutos. Usando uma caneta hidrofóbica desenhou-se um círculo ao redor dos cortes. Adicionou-se 200 µL da solução de bloqueio normal em cada lâmina e incubou-se as lâminas à temperatura ambiente durante 1 hora.

A solução de bloqueio normal foi composta por: 5% de soro de cabra em TBST 1 x. Em seguida foi removido a solução de bloqueio normal das lâminas. Adicionou-se 250 µl do anticorpo primário (diluição 1: 900 na solução de bloqueio normal) em cada lâmina e incubou-se as lâminas a 4 ° C durante a noite. No dia seguinte foi removido o anticorpo primário das lâminas. Lavou-se as lâminas 3 vezes por 5 minutos cada em solução tampão (TBST 1X). Após foi adicionado 250 ul do anticorpo secundário biotilado (IgG de cabra anti-coelho; diluição 1: 200 em solução de bloqueio). Incubou-se à temperatura ambiente por 1 hora na câmara de umidade preta. Após foi removido o anticorpo secundário das lâminas. Lavou-se as lâminas 3 vezes por 5 minutos cada em TBST 1X. Adicionou-se 200 ul da mistura VECTASTAIN Elite Standard ABC (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) em cada lâmina. Em seguida as lâminas foram colocadas na caixa de incubação preta em temperatura ambiente por 30 minutos. Adicionou-se 200 µl da solução de substrato de peroxidase (DAB) a cada lâmina. Incubou-se as lâminas à temperatura ambiente e observou-se as lâminas para coloração. A coloração adequada ocorreu entre 2 a 10 minutos. Lavou-se as lâminas com água destilada. Após as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos. Adicionou-se a solução de hematoxilina QS diretamente à lâmina, certificando-se de cobrir completamente os cortes por 30 a 45 segundos para contrastar. Lavou-se as lâminas com água da torneira até a água de enxague ficar limpa. Em seguida lavou-se as lâminas em etanol 100% por 2 minutos. Após foi realizado as montagens das lâminas.

Após coloração, os cortes foram descritos quanto à intensidade de imunomarcção (células epiteliais basais) por um observador independente cego quanto à origem do tecido.

Como banco de material para realização de estudos futuros, fragmentos de tecido lamelar foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados posteriormente em freezer a - 70° C.

2.8 Análise estatística

Os dados referentes aos graus de lesão histológica e da análise histomorfométrica foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk. As variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo teste-T student pareado, enquanto que os outros foram analisados pelo teste não paramétrico para avaliação de pares ordenados Wilcoxon quando comparados o grupo adCTM e o grupo placebo de cada animal pré e pós-tratamento, considerando significativo quando $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Classificação histopatológica lamelar e histomorfometria

Os principais achados histopatológicos observados no tecido lamelar pré-tratamento foram o colapso em LES (Figura 7) e lesões em membrana basal (separação) (Figura 8). No tecido lamelar pós-tratamento foram observados principalmente falta de homogeneidade lamelar epidermal, distorções ou filamentos das LEP, hiperplasia de estrato médio, lesões em membrana basal, ilhas epidérmicas isoladas queratinizadas e hiperqueratinização ao redor dos túbulos (Figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14), sendo estas mais evidenciadas no grupo placebo. Alguns animais chamaram a atenção por demonstrarem a arquitetura lamelar mais bem preservada no pós-tratamento com adCTM quando comparado ao placebo (Figuras 15, 16 e 17).

As características histopatológicas para cada equino usado no presente estudo pós-tratamento foram resumidas na Tabela 1 e 2. Em geral, o tecido lamelar dos equinos com laminite pré-tratamento exibiu distorções menos severas de LEP e LES em comparação ao tecido lamelar obtido pós-tratamento, demonstrando a evolução do quadro de laminite.

Os resultados das análises do grau de lesão histológica global em tecido lamelar pré e pós-tratamento estão nas Figuras 3, 4, 5 e 6. Enquanto no grupo placebo houve piora no escore global ($P = 0,01$), com destaque para perda do eixo queratinizado ($P = 0,0001$), hiperplasia do estrato médio ($P = 0,001$), homogeneidade das lamelas epidérmicas primárias ($P = 0,003$) e hiperqueratose ($P = 0,05$), no grupo adCTM não houve piora no escore global, havendo apenas um aumento para hiperplasia do estrato médio ($P = 0,05$). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos no pré-tratamento. Entretanto, diferenças significativas entre os grupos adCTM e placebo foram observadas no pós-tratamento para o escore de lesão global ($P \leq 0,05$), com destaque para a variável ausência de eixo queratinizado ($P \leq 0,01$).

Sobre a histomorfometria lamelar epidermal não houve diferença significativa entre os grupos adCTM e placebo, entretanto as lamelas epidérmicas no grupo placebo apresentaram valores inferiores ao final do estudo quando comparado ao momento basal ($P = 0,09$), fato não observado no grupo adCTM (Figura 18 e 19).

Tabela 1: Características histopatológicas do tecido lamelar de equinos com laminite (A1-A6) do grupo adCTM pós-tratamento.

ANIMAL	HISTOPATOLOGIA LAMELAR EM MEMBRO adCTM
A1	Leve falta de homogeneidade lamelar epidermal, hiperplasia em extrato médio e hiperqueratose. Presença de ilhas epidérmicas e túbulos queratinizados.
A2	Intensa falta de homogeneidade, distorção de LEP, hiperqueratose.
A3	Moderado colapso em LES e patologias em membrana basal.
A4	Leve falta de homogeneidade lamelar epidermal e distorção de LEP. Moderado colapso em LES e patologias em membrana basal.
A5	Leve distorção de LEP.
A6	Intensa falta de homogeneidade lamelar epidermal, hiperplasia em extrato médio, hiperqueratose, patologias em membrana basal. Presença de ilhas epidérmicas e túbulos queratinizados.

LEP – Lamela epidérmica primária; LES Lamela epidérmica secundária.

Tabela 2: Características histopatológicas do tecido lamelar de equinos com laminite (A1-A6) do grupo placebo pós-tratamento.

ANIMAL	HISTOPATOLOGIA LAMELAR EM MEMBRO PLACEBO
A1	Moderada ausência de LEP. Intensa falta de homogeneidade lamelar epidermal, distorção de LEP, hiperplasia em extrato médio, hiperqueratose, patologias em membrana basal. Presença de ilhas epidérmicas e túbulos queratinizados.
A2	Leve ausência de LEP. Intensa falta de homogeneidade lamelar epidermal, hiperplasia em extrato médio, hiperqueratose, patologias em membrana basal.
A3	Moderada falta de homogeneidade lamelar epidermal, distorção de LEP, hiperplasia em extrato médio, patologias em membrana basal.
A4	Moderada ausência de LEP. Intensa falta de homogeneidade lamelar epidermal, hiperplasia em extrato médio. Moderada patologia em membrana basal e colapso de LES.
A5	Intensa distorção e afilamento de LEP. Moderada hiperplasia em extrato médio e leve colapso em LES.
A6	Intensa falta de homogeneidade lamelar epidermal, hiperplasia em extrato médio, hiperqueratose, patologias em membrana basal. Presença intensa de ilhas epidérmicas e túbulos queratinizados.

LEP – Lamela epidermal primária; LES Lamela epidermal secundária.

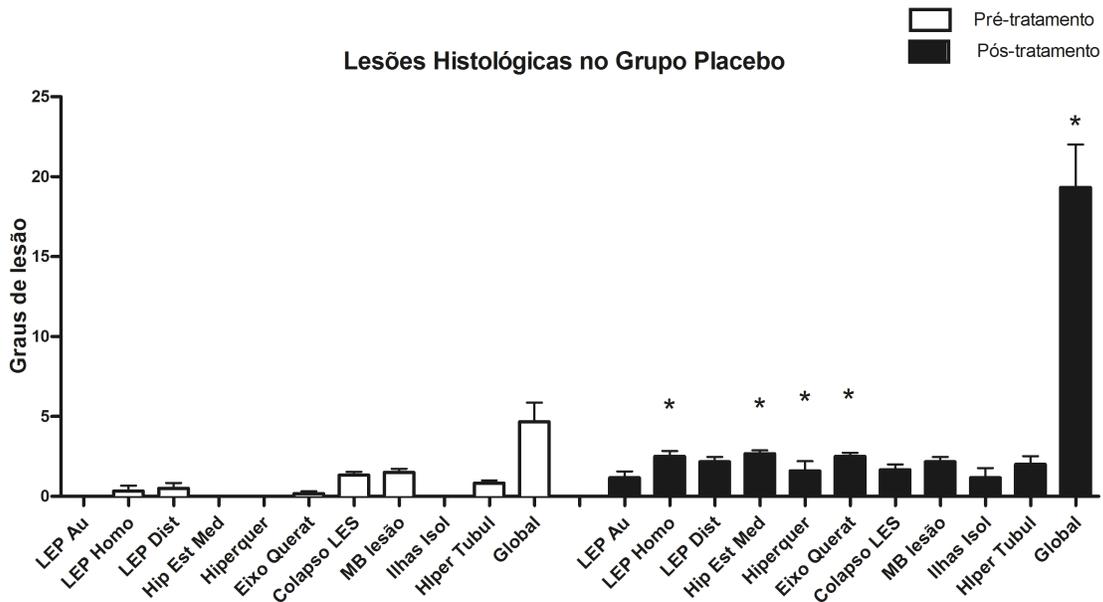


Figura 3: Valores médios e erros-padrão dos graus de lesões histológicas globais no tecido lamelar de equinos com laminite crônica no grupo placebo nos períodos pré e pós-tratamento.

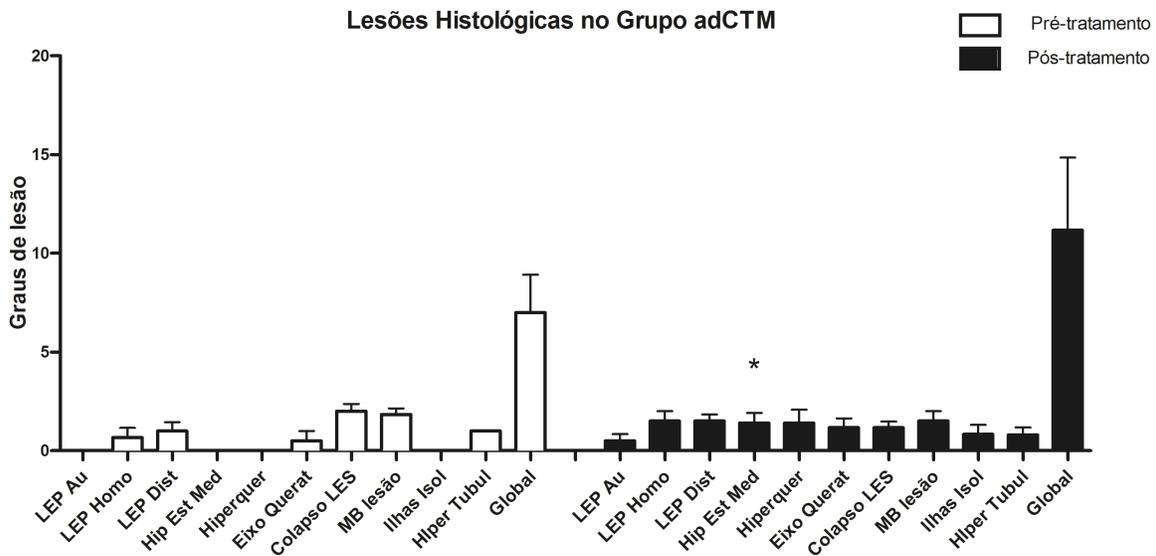


Figura 4: Valores médios e erros-padrão dos graus de lesões histológicas globais no tecido lamelar de equinos com laminite crônica no grupo adCTM nos períodos pré e pós-tratamento.

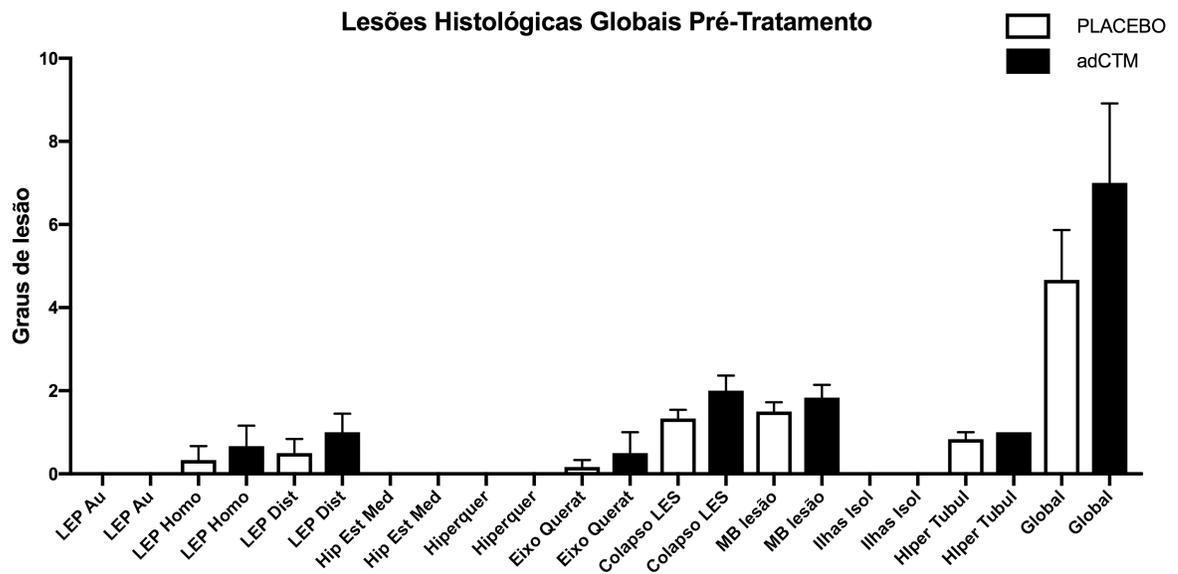


Figura 5: Valores médios e erros-padrão dos graus de lesões histológicas globais no tecido lamelar de equinos com laminite crônica pré-tratamento distribuídos em grupo adCTM ou placebo.

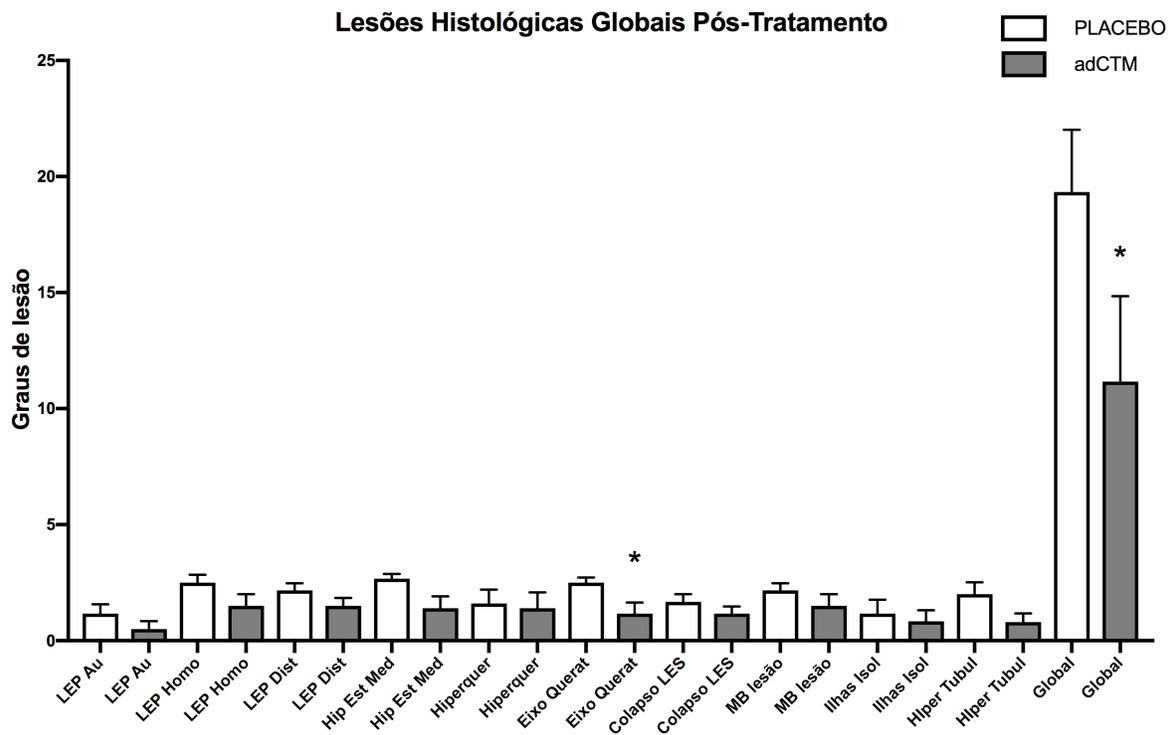


Figura 6: Valores médios e erros-padrão dos graus de lesões histológicas globais no tecido lamelar de equinos com laminite crônica pós-tratamento distribuídos em grupo adCTM ou placebo.

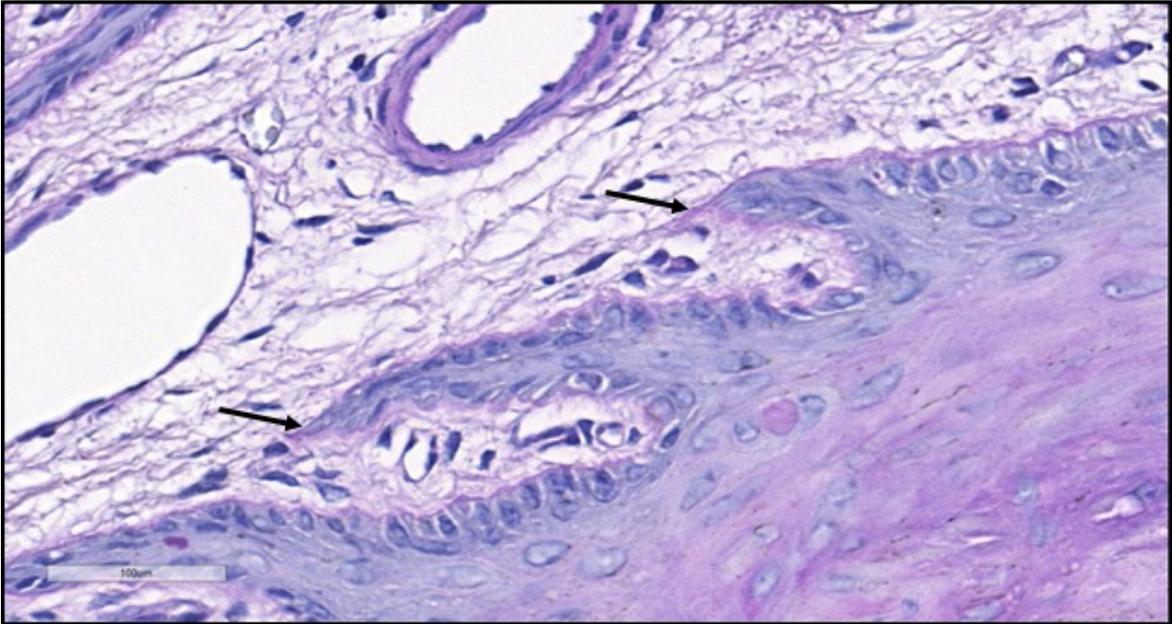


Figura 7: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 4 pré-tratamento MTE placebo). Observa-se LES apresentando colapso (setas pretas). Barra = 100 μm .

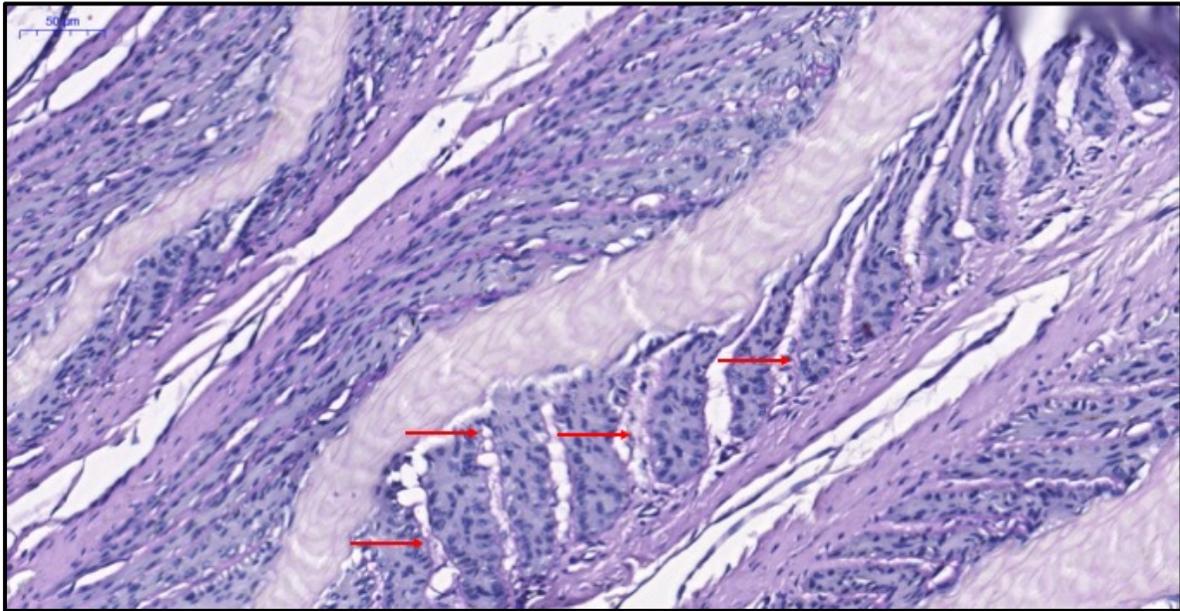


Figura 8: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 6 pré-tratamento MTE placebo). Observa-se lesão em membrana basal (separação) (setas vermelhas). Barra = 500 μm .

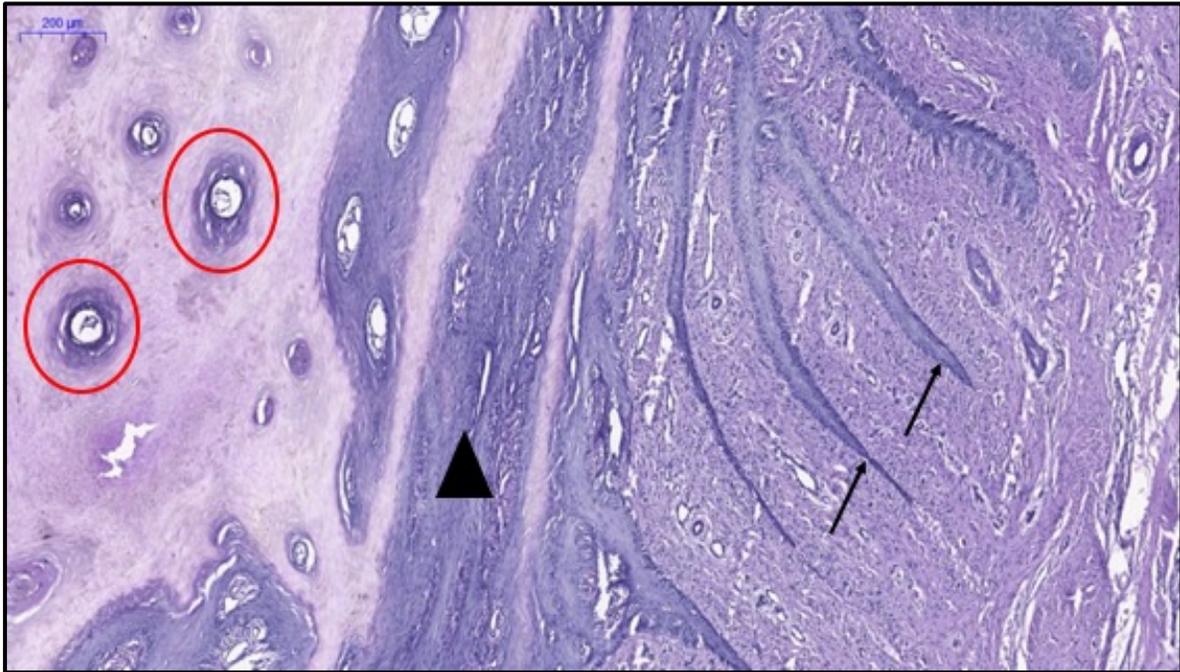


Figura 9: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 1 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se LEP apresentando encurtamento, afinamento e distorção, ausência de LES e o eixo queratinizado (setas pretas). Também observa-se hiperqueratose em camada entre os extratos lamelares médio e interno (triângulo) e ao redor dos túbulos presentes no extrato médio (círculos vermelhos). Barra = 200 μ m.

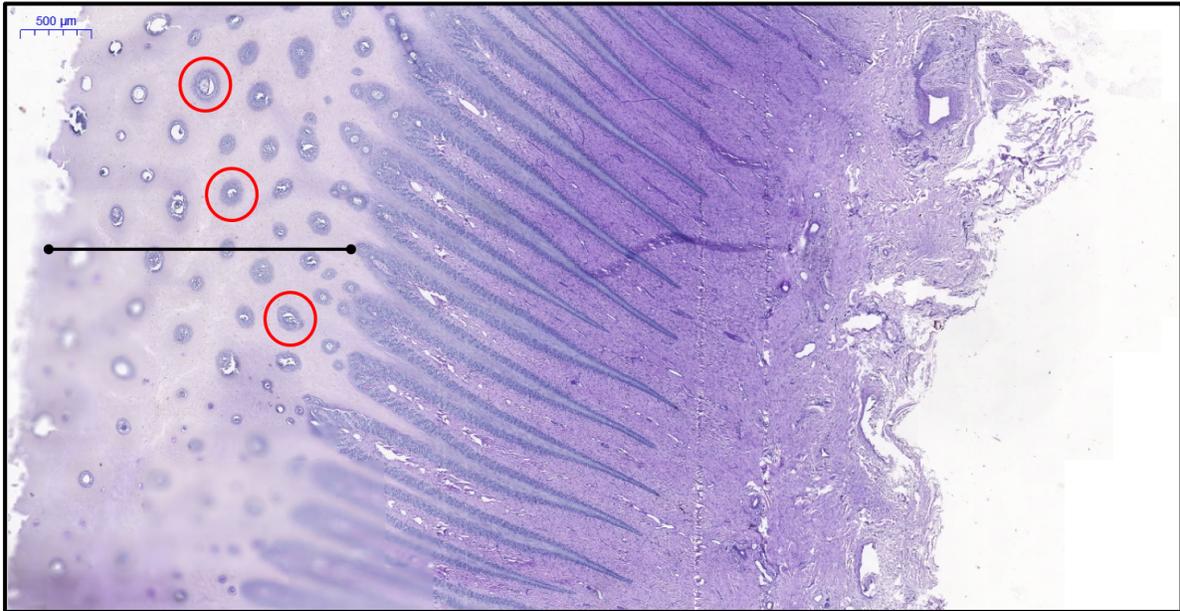


Figura 10: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 1 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se hiperplasia de extrato lamelar (linha preta) e hiperqueratinização ao redor de túbulos em extrato médio (círculos vermelhos). Barra = 500 μm.

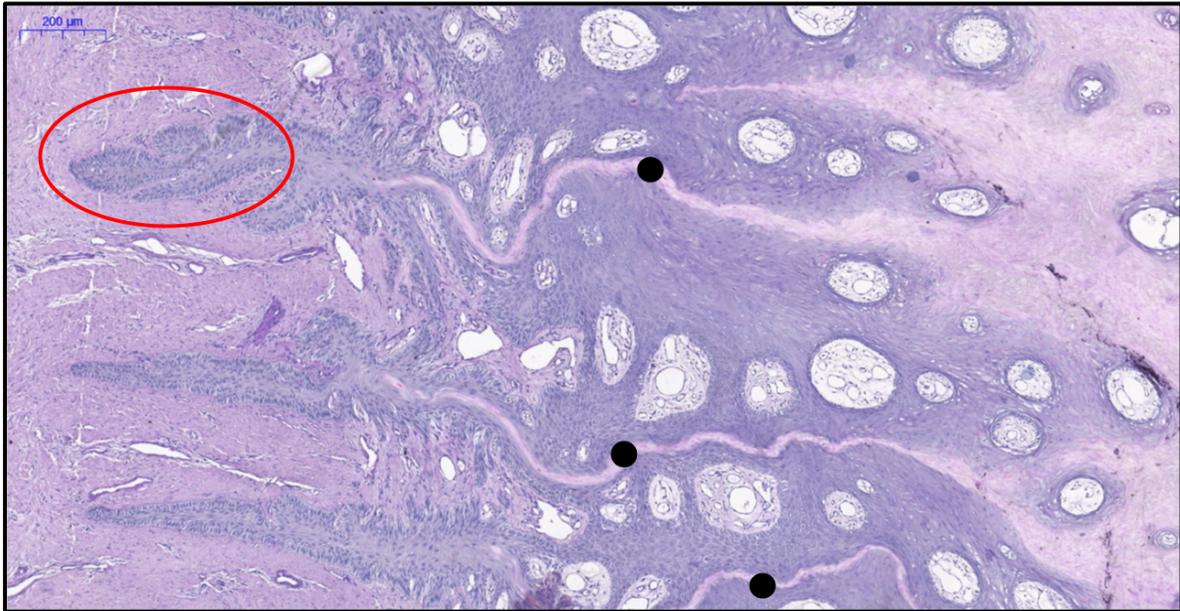


Figura 11: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 5 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se ausência de eixo queratinizado, distorção e encurtamento de LEP (pontos pretos), ilhas epidérmicas isoladas (círculo vermelho). Barra = 200 μm .

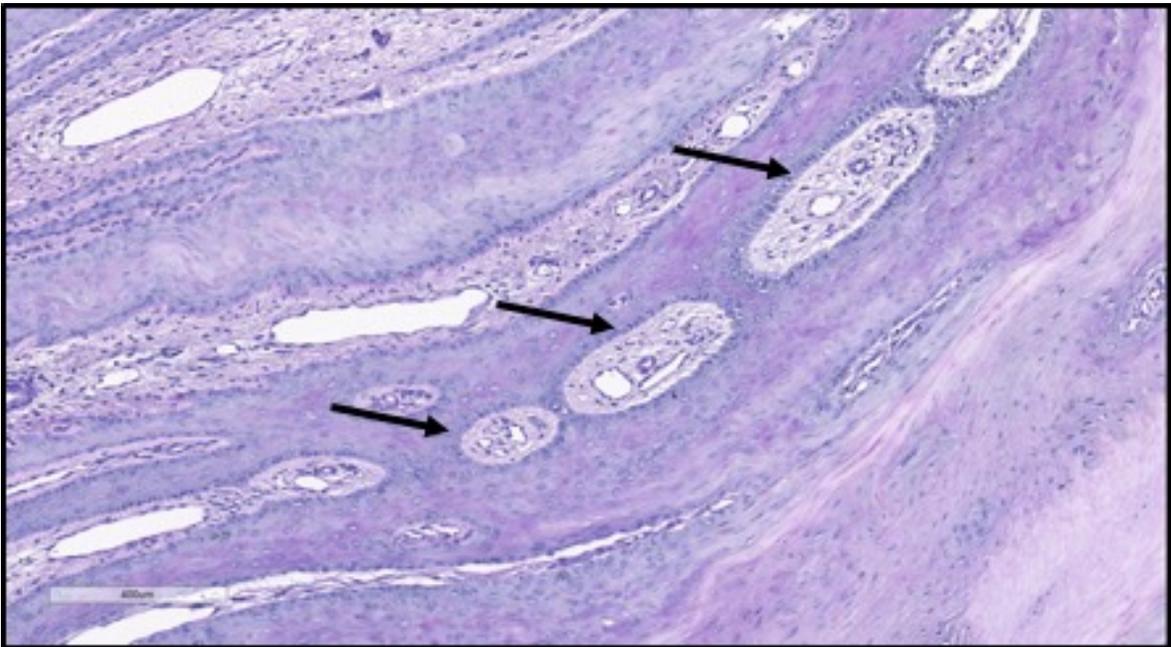


Figura 12: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 3 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se ilhas dermais abaxiais isoladas (setas pretas). Barra = 400 μm .

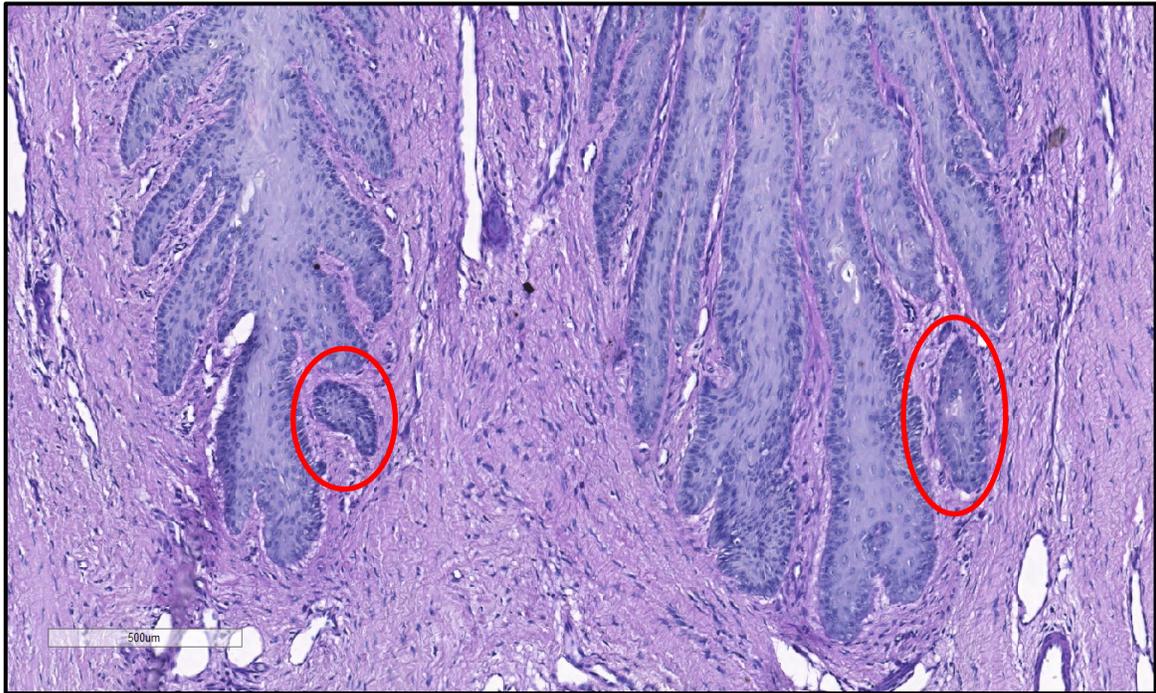


Figura 13: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 3 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se ilhas epidérmicas isoladas (círculos vermelhos). Barra = 400 μm.

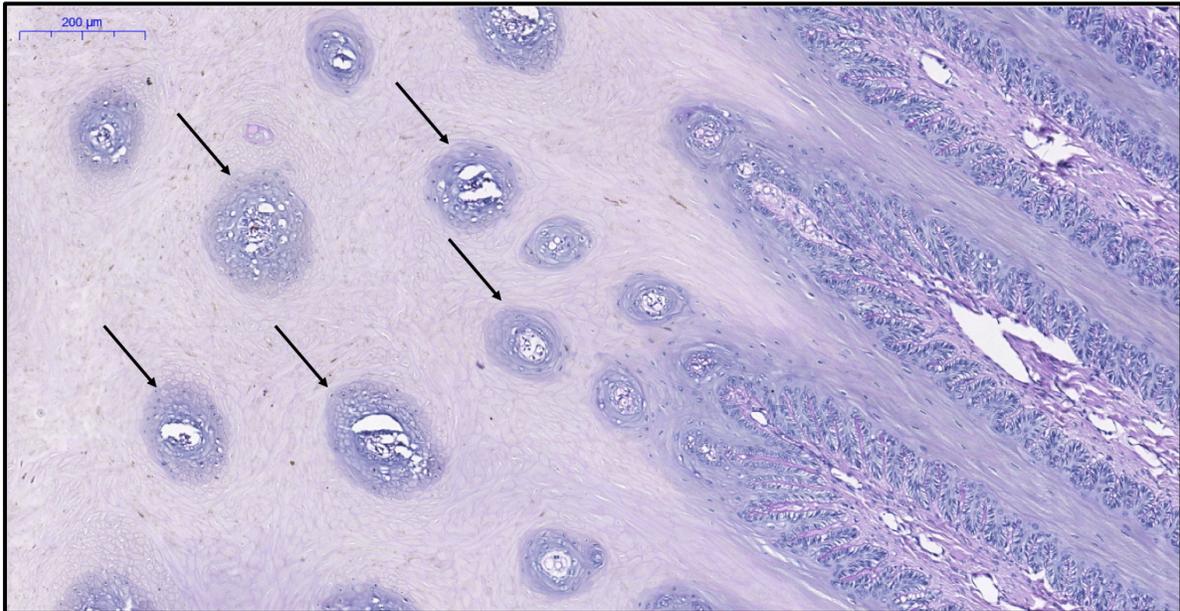


Figura 14: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica (Animal 5 pós-tratamento MTD placebo). Observa-se hiperqueratinização ao redor de túbulos em extrato médio (setas pretas). Barra = 200 μm .

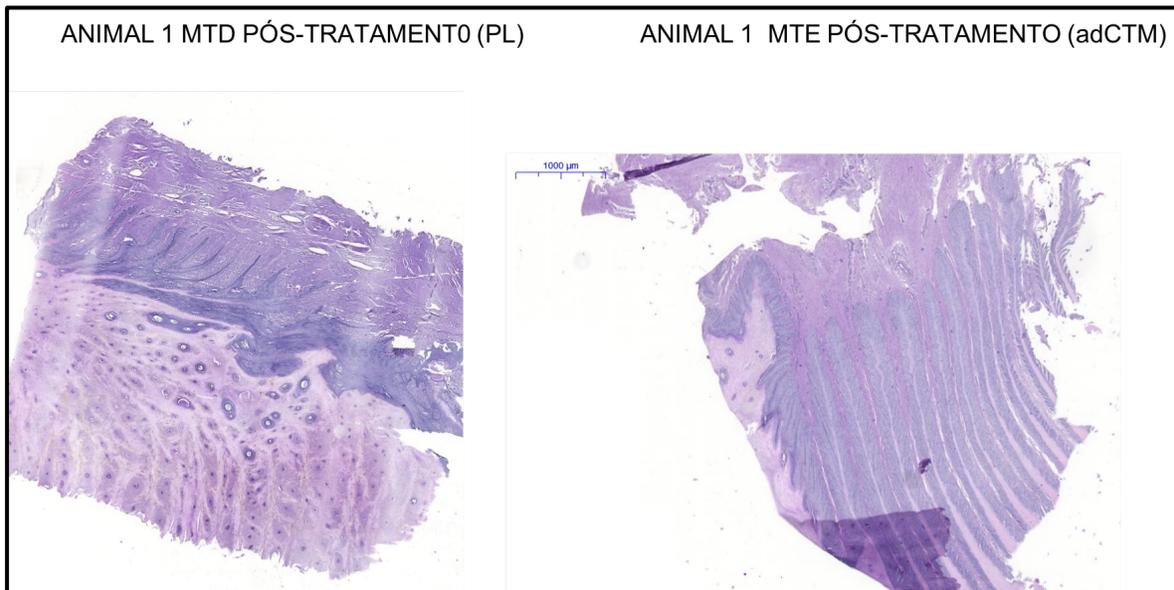


Figura 15: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica 45 dias após o início do tratamento com adCTM ou placebo (à esquerda membro placebo e a direita membro adCTM). Nota-se nítida diferença entre as arquiteturas lamelares. No membro placebo observa-se redução da espessura do extrato lamelar que apresenta LEP encurtadas, ausência de LES e eixo queratinizado e marcada hiperplasia de extrato médio. Verifica-se ainda intensa hiperqueratose entre o extrato médio e lamelar e ao redor dos túbulos. A direita membro adCTM demonstrando arquitetura lamelar mais preservada com LEP homogêneas, presença de eixo queratinizado e LES. A hiperqueratose e a hiperplasia de extrato lamelar são pouco evidentes. Barra = 1000 µm.

ANIMAL 3 MTD PÓS-TRATAMENTO (PL)

ANIMAL 3 MTE PÓS-TRATAMENTO (adCTM)

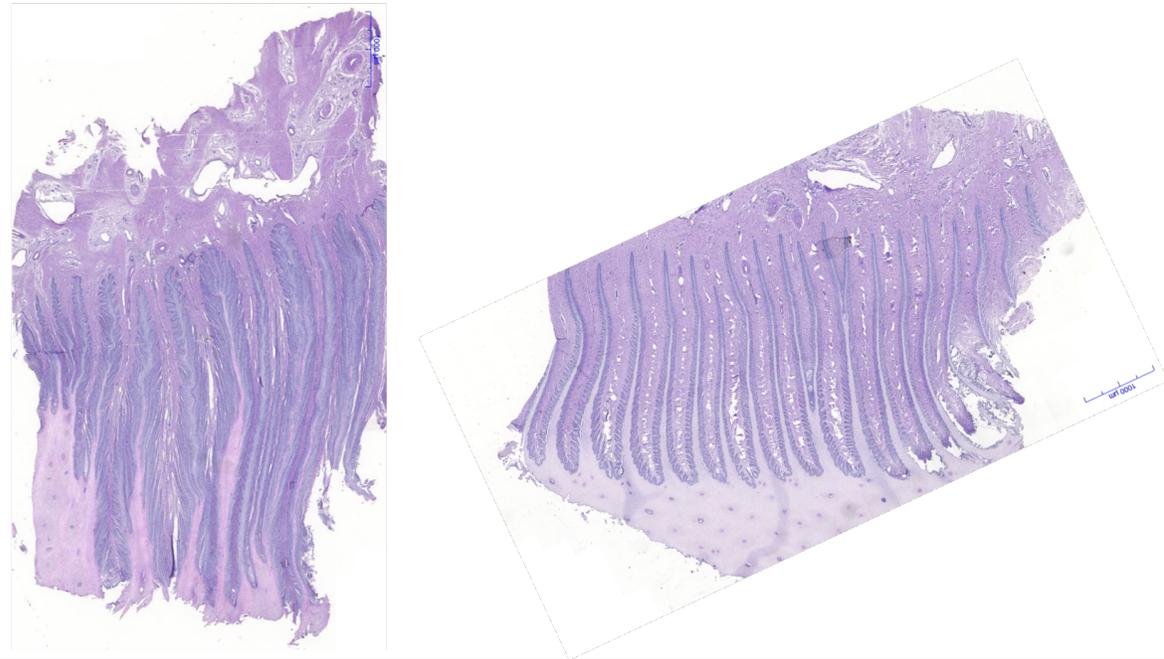


Figura 16: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica 45 dias após o início do tratamento com adCTM ou placebo (à esquerda membro placebo e a direita membro adCTM). Nota-se nítida diferença entre as arquiteturas lamelares. No membro placebo observa-se falta de homogeneidade lamelar epidermal, grau de encurtamento ou distorção das lamelas epidérmicas primárias, presença de hiperplasia do extrato médio. A direita membro adCTM demonstrando arquitetura lamelar mais preservada com LEP homogêneas, presença de eixo queratinizado e LES. Barra = 1000 µm.

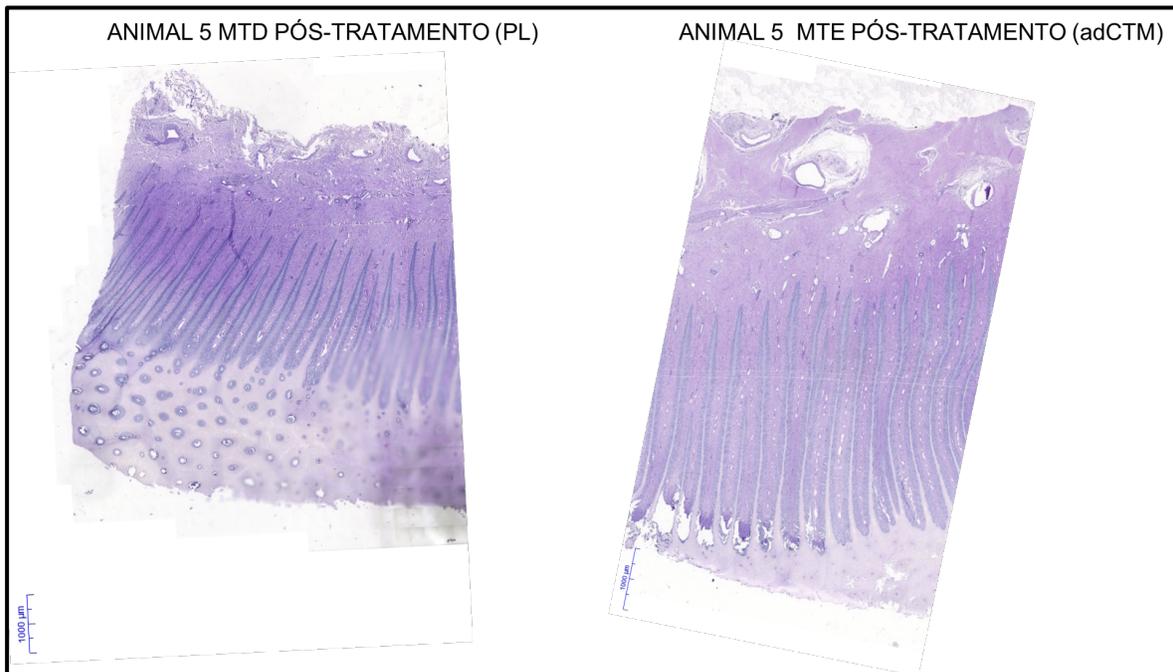


Figura 17: Fotomicrografia do tecido lamelar de equino com laminite crônica 45 dias após o início do tratamento com adCTM ou placebo (à esquerda membro placebo e a direita membro adCTM). Nota-se nítida diferença entre as arquiteturas lamelares. No membro placebo à esquerda observa-se redução da espessura do extrato lamelar que apresenta LEP encurtadas, ausência de LES e eixo queratinizado, e marcada hiperplasia de extrato médio. Verifica-se ainda intensa hiperqueratose entre o extrato médio e lamelar e ao redor dos túbulos. A direita membro adCTM demonstrando arquitetura lamelar mais preservada com LEP homogêneas, presença de eixo queratinizado e LES. A hiperqueratose e a hiperplasia de extrato lamelar são pouco evidentes. Barra = 1000 µm.

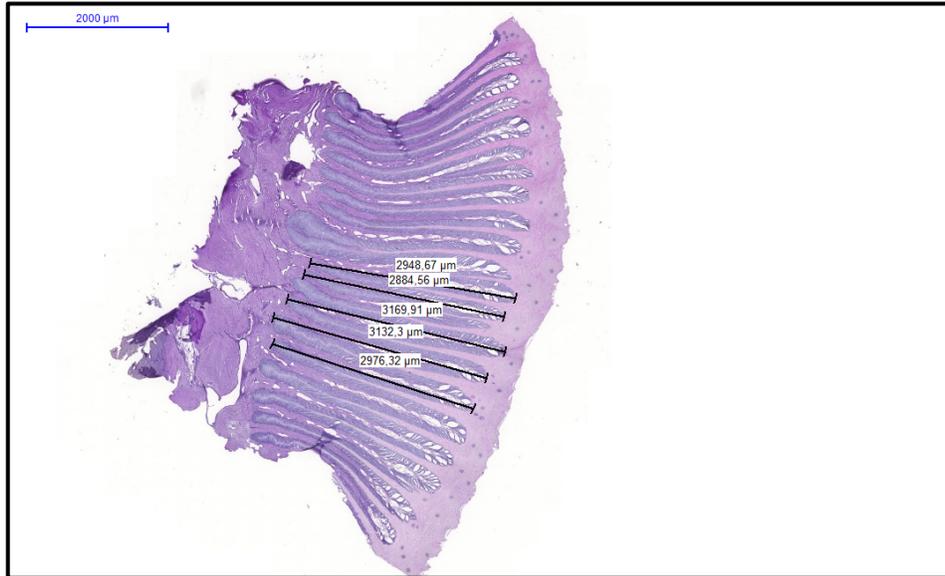


Figura 18: Fotomicrografia do fragmento de uma amostra de biópsia de um equino com laminite crônica do membro adCTM no momento basal, submetida à análise histológica e medição do comprimento total de lamela epidermal. Observa-se a camada fina de tecido queratinizado no lado direito seguido por várias lamelas epidérmicas primárias no meio e no lado esquerdo derme. Barra = 2000 μm.

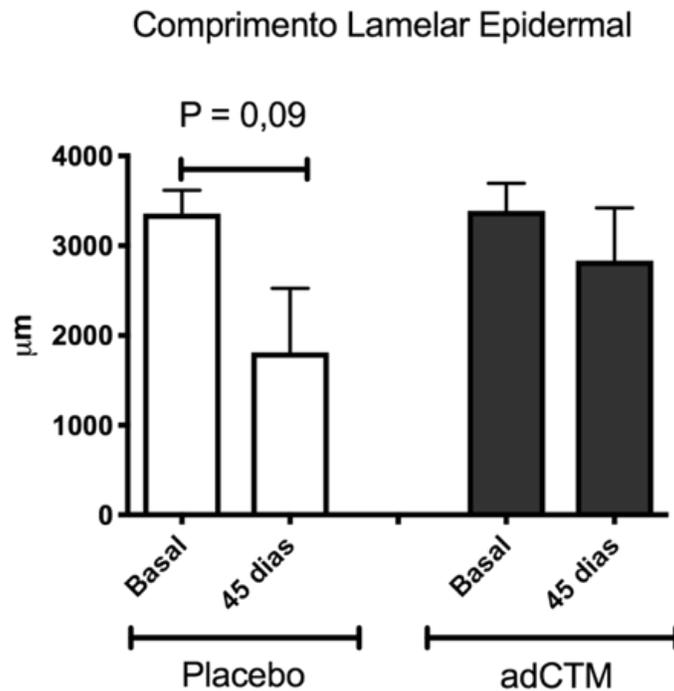


Figura 19: Valores médios e erros-padrão dos comprimentos totais das lamelas epidérmicas primárias em equinos com laminite crônica submetidos a terapia com células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (adCTM) ou placebo (NaCl 0,9%).

3.2 Imunohistoquímica para p63

Nos tecidos lamelares previamente testados em equino saudável, o p63 foi expresso nos núcleos das CE basais e suprabasais (Figura 20). No tecido lamelar dos equinos com laminite crônica deste estudo, foi possível a identificação da expressão de p63 nos núcleos das CE basais e suprabasais tanto em amostras do grupo adCTM quanto do placebo, no momento basal ou após 45 dias. Entretanto houve intensa presença de coloração inespecífica, o que impossibilitou uma comparação fidedigna entre tempos e grupos (Figura 21 e 22).

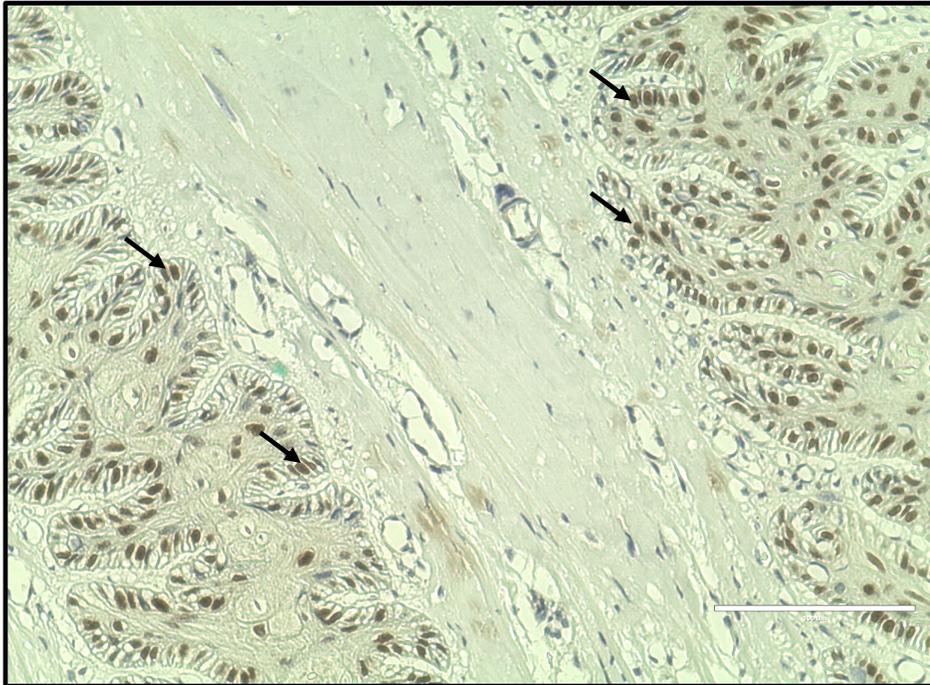


Figura 20: Fotomicrografia do teste realizado em tecido lamelar de animal saudável, sendo possível verificar a presença de células tronco epiteliais basais apresentando imunomarcacão positiva de p63 (setas). Barras = 200 μ m.

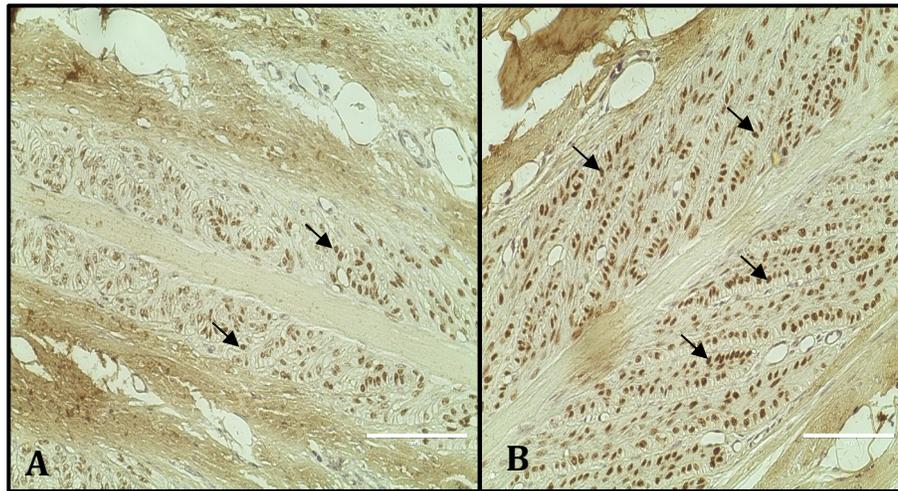


Figura 21: Fotomicrografia do tecido lamelar animal 1 (A, B). Em (A), uma amostra de tecido lamelar do membro adCTM em um equino com laminite crônica em momento basal, sendo possível verificar algumas células tronco epiteliais basais apresentando imunomarcção positiva de p63 (setas). Em (B), o mesmo membro adCTM 45 dias após início do tratamento (setas). Barras = 100 μ m.

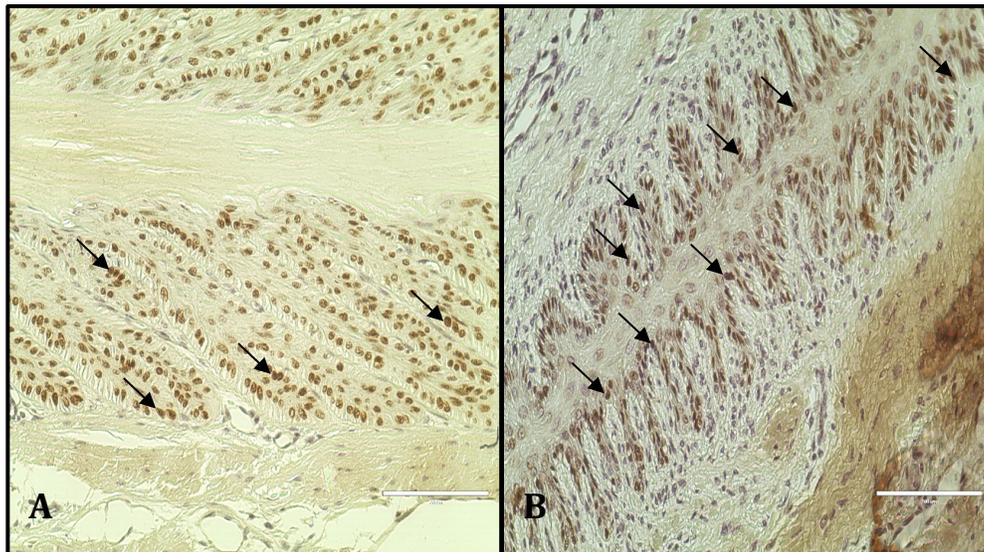


Figura 22: Fotomicrografia do tecido lamelar animal 2 (A, B). Em (A), uma amostra de tecido lamelar do membro adCTM em um equino com laminite crônica em momento basal, sendo possível verificar algumas células tronco epiteliais basais apresentando imunomarcacão positiva de p63 (setas). Em (B), o mesmo membro adCTM 45 dias após início do tratamento (setas). Barras = 100 μ m.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, a amostra de tecido lamelar, constituído por lamelas dérmicas e epidérmicas, foi adequado para a avaliação histopatológica das alterações correspondentes a laminite consideradas por Pollitt (1996), sem a influência de artefatos que pudessem ser atribuídos à técnica da biópsia empregada. Este foi o primeiro estudo com biópsias seriadas de tecido lamelar de equinos em fase inicial de laminite crônica, afim de avaliar influência terapêutica das adCTM ou placebo sobre a arquitetura lamelar por meio de avaliação do grau de lesão histológica. Contudo, houve dificuldade na obtenção de amostras lamelares em alguns animais durante as biópsias no pós-tratamento, principalmente atribuída à má qualidade e a fragilidade do tecido lamelar, que em alguns casos apresentava hiperplasia de extrato médio. Resultados positivos também foram relatados por Ribeiro et al (2017) com o uso do instrumento de biópsia lamelótomo de Falcão-Faleiros, que se demonstrou vantajoso frente a técnicas anteriormente descritas (Gravena et al., 2012).

Em nosso estudo, as principais características histopatológicas evidenciadas durante a fase pré-tratamento foram o colapso de LES e alterações em membrana basal. Os primeiros relatos descrevendo alterações histológicas em equinos com laminite ocorreram nos anos 80 (Roberts et al., 1980). Estudos descrevendo as alterações histológicas em equinos com laminite aguda caracterizavam a atenuação e o afinamento das lamelas e a separação da membrana basal (Pollitt 1996; Johnston et al.1998; Pollitt e Daradka 1998; Morgan et al.1999). Em 1999 já era considerado como marca registrada das alterações histológicas observadas na laminite crônica as alterações degenerativas e displásicas das lamelas epidérmicas primárias e secundárias, incluindo vacuolização epitelial ou necrose e vacuolização dérmica-epidérmica e edema (Morgan et al., 1999). Também foram descritas alterações displásicas durante a fase crônica incluindo alargamento, fusão, encurtamento ou perdas das lamelas epidérmicas primárias e secundárias. As alterações arquiteturais são principalmente restritas as LES, quando a lesão é leve, com envolvimento das lamelas primárias ocorrendo em maior gravidade (Morgan et al., 1999). Em outro estudo realizado em equinos com laminite experimentalmente induzida com oligofrutose revelou-se aspectos histopatológicos sete dias após a sobrecarga alimentar, em que os processos de deslocamento de membrana basal e lise de membrana basal verificados durante a fase aguda tenderam a diminuição durante a fase crônica. A principal anormalidade encontrada foi a mudança abrupta na arquitetura lamelar. A anatomia normal da LEP e da LES foi severamente interrompida. A formação de ilhas epidérmicas, muitas não mais ligadas a suas respectivas LEP, causa a perda de sua função em manter o aparato suspensor entre a muralha dorsal de estojo córneo e a falange distal (Van Eps & Pollitt, 2009).

No escore de lesão histológica global do grupo placebo houve piora ao final do estudo quando comparado ao pré-tratamento, destacando-se as variáveis perda do eixo queratinizado, hiperplasia do estrato médio, homogeneidade das lamelas epidermais primárias e hiperqueratose. No entanto, no grupo adCTM não houve piora. Este resultado demonstra o efeito preventivo da evolução das lesões no grupo adCTM.

Thomason et al. (2008) associaram alterações no estojo córneo com alterações na junção lamelar, sugerindo um remodelamento das lamelas epidérmicas primárias induzidas pelo estresse. Assim, a mudança em um dos componentes do estojo córneo altera estruturas adjacentes, uma vez que o estojo córneo atua como uma unidade integrada (Redden, 2003). O presente estudo corrobora com as afirmações descritas pelos autores, em que nossos resultados demonstraram ter ocorrido uma evolução natural da doença em todos animais estudados, confirmados pelas características histopatológicas encontradas, e também demonstrados nos resultados apresentados no capítulo anterior. Na fase pós-tratamento o grupo adCTM demonstrou-se mais bem preservado quando comparado ao grupo placebo, apresentando menor grau de lesão histológica global e maior presença do eixo queratinizado.

O valor terapêutico das CTMs adultas pode ser baseado não apenas na sua contribuição para o restabelecimento da arquitetura dos tecidos danificados, mas também na sua capacidade comprovada em modular a resposta inflamatória. As CTMs apresentam efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores potentes, através de interações célula-

célula e ou liberação de fatores solúveis de crescimento no ambiente local. Ainda possuem um perfil ou imunofenotipagem distinta de fatores bioativos tróficos, mediadores inflamatórios e moléculas de adesão que atuam inibindo a formação da cicatrização e apoptose, aumentam angiogênese e estimulam células progenitoras intrínsecas levando ao retorno da homeostase do tecido (Caplan, 2009), além de secretarem uma grande variedade de quimiocinas, expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento podendo, desta forma, interagir por efeito parácrino com células residentes e induzir a diferenciarem em linhagens diferentes (Takahashi et al., 2007; Monteiro et al., 2010). Contudo, não foi verificado o efeito sobre as quimiocinas e células inflamatórias no presente estudo. Ainda, em nosso estudo, não houve diferença estatística nos resultados para histomorfometria epidermal. Entretanto, os valores encontrados para o tamanho das lamelas epidérmicas primárias ao final do estudo foram inferiores quando comparados ao momento basal no grupo placebo (P=0,09), o que não ocorreu no grupo tratado com adCTM. Este achado sugere haver maior preservação da arquitetura lamelar epidermal no membro tratado com adCTM, em consonância a outros achados descritos neste estudo.

Resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo também foram relatados com a aplicação local de CTMs em lesões musculoesqueléticas. Um estudo em equinos com osteoartrite induzida e tratada com CTM e plasma demonstrou melhorias no fluido sinovial, diminuição de linhas de desgaste em cartilagem articular e hiperemia sinovial (Broeckx et al., 2019). Já em outro estudo também realizado em equinos com tendinite induzida e tratados com CTM houve prevenção na progressão das lesões, melhora na organização das fibras colágenas e a diminuição da resposta inflamatória (Carvalho et al., 2014).

O efeito sistêmico das adCTM hipotetizado neste estudo não foi evidenciado no grupo placebo por meio das avaliações de histomorfometria e o grau de lesão histológica lamelar, uma vez que melhoras percebidas no grupo adCTM não ocorreram no grupo placebo. Este resultado corrobora com um estudo prévio em equinos com tendinite induzida e tratada localmente com CTM marcadas por nanocristais, que foram detectadas no membro tratado mais não no membro contralateral (Carvalho et al., 2014). Entretanto, estudos *in vivo* demonstraram que as células implantadas periféricamente são capazes de migrar e alcançar o local alvo por uma propriedade especializada de “homing” conhecida por ser facilitada por fatores humorais, embora o mecanismo exato ainda não tenha sido completamente compreendido (Kode et al., 2009; Guest et al., 2010; McDuffee et al., 2012). Os possíveis mecanismos envolvidos no “homing” promovidos pelas CTMs de equinos podem ser a expressão do SDF-1 e seu receptor CXCR4 (Angelone et al., 2017) e moléculas de adesão como galectina-1 e galectina-3 (Reesink et al., 2017), principais fatores estes para o recrutamento celular em os tecidos inflamados e danificados. No presente estudo, o direcionamento das células para a lesões de laminite crônica no grupo placebo, no entanto, permanece questionado, além do mais, a concentração de adCTM alcançada após uma infusão parenteral pode não ser igual à de infusão por perfusão regional, modalidade esta escolhida para tratamento neste estudo e limitada pelo número de células passivos de ação terapêutica sem ocorrência de consequências tais como tromboembolismo e reações inflamatórias exacerbadas locais (Schnabel et al., 2013).

Apesar de não existirem estudos prévios com uso de um marcador imunohistoquímico para p63 equino em amostras preservadas em parafina, no presente estudo o protocolo adaptado de imunomarcção para p63 recomendado pelo fabricante demonstrou-se capaz em reconhecer a expressão e a localização de células-tronco epiteliais em tecido lamelar de equino hígado. Entretanto, um fator limitante observado foi a aplicação do mesmo protocolo em amostras de tecidos lamelares de equinos com laminite crônica, em que houve dificuldade em manter a amostra fixada em lâmina de vidro durante a fase de recuperação antigênica, demonstrando a alta sensibilidade requerida nesse processo e também devido as características do tecido estudado. A porção queratinizada da amostra muitas vezes se descola da lâmina e favorece a perda completa da amostra. As CTE residem na camada basal dos epitélios estratificados lamelares e são essenciais para a manutenção da homeostase tecidual, regeneração após lesão e enxerto terapêutico bem-sucedido (Blanpain & Fuchs, 2009). No caso do estojo córneo do equino, o crescimento contínuo é necessário para substituir o casco perdido na superfície do solo (Daradka & Pollitt, 2004). O papel das CTE no crescimento do estojo córneo, homeostase e laminite já foi estudado (Carter et al., 2011; Linardi et al., 2015). O fator de transcrição p63 é um determinante chave da linhagem específica da capacidade proliferativa em células-tronco de epitélios estratificados (Senoo et al., 2007). O gene p63 gera múltiplas isoformas com papéis biológicos distintos (Yang et al., 1998), dos quais $\Delta Np63\alpha$ desempenham um papel essencial nas células-tronco epiteliais (Senoo et al., 2007).

No presente estudo, os resultados encontrados demonstram melhorias no tecido cicatricial dos membros tratados com adCTM se comparado aos membros placebos. Tais resultados podem ser atribuídos ao fato de que os equinos incluídos no estudo se encontravam em estágio inicial de laminite crônica, favorecendo esta modalidade terapêutica. Sobre o momento ideal para a primeira aplicação de CTMs, este é atualmente desconhecido, entretanto, sabe-se que para maior benefício, a terapia com CTMs seria mais eficaz quando realizada antes da ocorrência de hiperplasia da cunha lamelar ou da célula epidérmica (Dryden et al., 2013; Morrison et al., 2014; Gugjoo & Sharma, 2019). Sabe-se que esse processo ocorre dentro de 30 dias do deslocamento do osso apendicular (Kuwano et al., 2002). Considerados em conjunto estas afirmações indicam de que a aplicação de adCTM de forma mais precoce poderia ser ainda mais vantajosa.

5. CONCLUSÃO

As lesões histológicas foram compatíveis com quadro de laminite e apresentaram evolução ao longo do estudo. O tratamento com adCTM promoveu melhorias no processo cicatricial lamelar no membro infundido, corroborando aos achados do capítulo anterior e ainda atuou prevenindo a progressão destas lesões. Os achados confirmam parte da hipótese sobre melhorias nas avaliações histológicas, contudo estas só ocorreram nos membros perfundidos

pelas adCTM, não verificando o mesmo efeito benéfico no grupo placebo. Desta forma confirma-se o potencial terapêutico das adCTM no tratamento de equinos em estágio inicial de laminite crônica, conforme o protocolo terapêutico utilizado neste estudo, devendo o mesmo ser infundido localmente em cada um dos membros acometidos.

6. REFERÊNCIAS

BLANPAIN C, FUCHS E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v.10, p. 2-7-218, 2009.

BROECKX SY, MARTENS AM, BERTONE AL, VAN BRANTEGEM L, DUCHATEAU L, VAN HECKE L, DUMOULIN M, OOSTERLINCK M, CHIERS K, HUSSEIN H, PILLE, F, SPAAS JH. The use of equine chondrogenic-induced mesenchymal stem cells as a treatment for osteoarthritis: a randomised, double-blinded, placebo-controlled proof-of-concept study. *Eq. Vet. J.*, 2019.

BURG E, DIEPENBROEK C, HOORNEMAN N, LICHTENBERG E. Explorative Study of the Natural Balance Method of Hoof Care in Horses. Wageningen University and Research Center, Wageningen. 2007.

CARTER RA, ENGILES JB, MEGEE SO, SENOO M, GALANTINO-HOMER HL. Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. *Eq. Vet. J.*, v. 43, p. 543-551, 2011.

CARVALHO ADM, YAMADA ALM, GOLIM MA, ÁLVAREZ LEC, HUSSNI CA, ALVES ALG. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Eq. Vet. J.*, v. 46, p. 635-638, 2014.

CARVALHO AM, BADIAL PR, ÁLVAREZ LEC, YAMADA ALM, BORGES AS, DEFFUNE E, HUSSNI CA, ALVES ALG. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. *Stem Cell Res. Ther.*, v. 4, p. 85, 2013.

CANIGLIA CJ, SCHRAMME MC, SMITH RK. The effect of intralesional injection of bone marrow derived mesenchymal stem cells and bone marrow supernatant on collagen fibril size in a surgical model of equine superficial digital flexor tendonitis. *Eq. Vet. J.*, v. 44, p. 587-593, 2012.

COLLINS SN, VAN EPS AW, POLLITT CC, KUWANO, A. The lamellar wedge. *Vet. Clin. Eq. Pract.*, v. 26, p. 179-195, 2010.

CAPLAN AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The J. Path.*, V. 217, p. 318-324, 2009.

- DARADKA M, POLLITT CC. Epidermal cell proliferation in the equine hoof wall. *Eq. Vet. J.*, v. 36, p. 236-241, 2004.
- DE LAAT MA, VAN EPS AW, MCGOWAN CM, SILLENCE MN, POLLITT CC. Equine laminitis: Comparative histopathology 48 hours after experimental induction with insulin or alimentary oligofructose in Standardbred horses. *J. Comp. Pathol.*, 145. v. 4, p. 399-409, 2011.
- DRYDEN VC, MORRISON S, BRAS R, MORRELL SA. Using stem cells in clinical cases. *J. Eq. Vet. Sci.*, v. 33, p. 872-873, 2013.
- FALEIROS RR, LEISE BS, WATTS M, JOHNSON PJ, BLACK SJ, BELKNAP JK. Lamellar chemokine mRNA concentrations in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *Vet. Immun. Immunopath.*, v. 144, p. 45-51, 2011a.
- FALEIROS RR, JOHNSON PJ, NUOVO GJ, MESSER NT, BLACK SJ, BELKNAP JK. Lamellar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *J. Vet. Int. Med.*, v. 25, p. 107-115, 2011b.
- FERRIS D, FRISBIE D, KISIDAY J, MCILWRAITH CW. In vivo healing of meniscal lacerations using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and fibrin glue. *Stem cells International*, 2012.
- GARBIN L, SOARES AS, CASSALI GD, VASCONCELOS AC, FALEIROS RR. Histological and immunohistochemical evaluation of two protocols of stem cell therapy in equine suspensory ligament repair. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 2019.
- GRAVENA K, DE LIMA SAMPAIO RDC, DIAS DPM, CANOLA PA, PEIRÓ JR, DE LACERDA-NETO JC. Evaluation of the integrity of horse hoof dermal and epidermal tissues collected by dorsal transmural access. *J. Eq. Vet. Sci.*, v. 32, p. 858-862, 2012.
- GROSENBAUGH DA, MORGAN SJ, HOOD DM. The digital pathologies of chronic laminitis. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v. 15, p. 419-436, 1999.
- GUEST DJ, SMITH MRW, ALLEN WR. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Eq. Vet. J.*, v. 42, p. 636-642, 2010.
- GUGJOO MB, SHARMA GT. Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization and potential therapeutic Applications. *J. Eq. Vet. Sci.*, v. 72, p. 16-27, 2019.
- HOOD DM. The mechanisms and consequences of structural failure of the foot. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v. 15, p. 437-461, 1999.
- KODE JA, MUKHERJEE S, JOGLEKAR MV, HARDIKAR AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytherapy*, v. 11, p. 377-391, 2009.

- KUWANO A, KATAYAMA Y, KASASHIMA Y, OKADA K, REILLY JD. A gross and histopathological study of an ectopic white line development in equine laminitis. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 64, p. 893-900, 2002.
- LACITIGNOLA L, CROVACE A, ROSSI, G FRANCIOSO E. Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. *Vet. Res. Communic.*, v. 32, p. 33-38, 2008.
- LANCASTER LS, BOWKER RM, MAUER WA. Density and Morphologic Features of Primary Epidermal Laminae in the Feet of Three-Year-Old Racing Quarter Horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 68, p. 11-19, 2007.
- LINARDI RL, MEGEE SO, MAINARDI SR, SENOO M, GALANTINO-HOMER HL. Expression and localization of epithelial stem cell and differentiation markers in equine skin, eye and hoof. *Vet. Dermat.*, v. 26, p. 213-247, 2015.
- MCDUFFEE LA, PACK L, LORES M, WRIGHT GM, ESPARZA-GONZALEZ B, MASAOU D, E. Osteoprogenitor cell therapy in an equine fracture model. *Vet. Surg.*, v. 41, p. 773-783, 2012.
- MONTEIRO BS, NETO A, MARTINS N, DEL CARLO RJ. Mesenchymal stem cell. *Ciência Rural*, v. 40, p. 238-245, 2010.
- MORGAN SJ, GROSENBAUGH DA, HOOD DM. The pathophysiology of chronic laminitis: pain and anatomic pathology. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v. 15, 395-417, 1999.
- MORRISON, S. Chronic laminitis foot management. *Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.*, v.26, n.2, p.425-446, 2010.
- MORRISON S, DRYDEN VC, BRAS R, MORRELL S. How to use stem cells in clinical laminitis cases. In Proceedings of the 60th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Salt Lake City, Utah, USA, December 6-10, American Association of Equine Practitioners (AAEP), p. 499-503, 2014.
- PERONI JF, BORJESSON DL. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. *Vet. Clin. Eq. Pract.*, v. 27, p. 351-362, 2011.
- POLLITT CC. Clinical anatomy and physiology of the normal equine foot. *Eq. Vet. Educ.*, v. 4, p. 219-224, 1992.
- POLLITT CC. Anatomy and Physiology of the Inner Hoof Wall. *Eq. Vet. J.*, v. 3, p. 3-21, 2004.
- POLLITT CC. Equine laminitis – Current concepts. Canberra (Australia): Rural Industries Research and Development Corporation. p. 116, 2008.
- ROBERTS ED, OCHOA R, HAYNES PF. Correlation of dermal-epidermal laminar lesions of equine hoof with various disease conditions. *Vet. Pathol.*, v. 17, p. 656-666, 1980.
- REESINK HL, SUTTON RM, SHURER CR, PETERSON RP, TAN JS, SU J, PASZEK MJ, NIXON AJ. Galectin-1 and galectin-3 expression in equine mesenchymal stromal cells

(MSCs), synovial fibroblasts and chondrocytes, and the effect of inflammation on MSC motility. *Stem Cell Res. Ther.*, v. 8, p. 243, 2017.

REDDEN RF. Hoof capsule distortion: understanding the mechanisms as a basis for rational management. *Vet. Clin. North Am. Eq. Pract.*, v.19, p. 443-462, 2003.

SENOO M, PINTO F, CRUM CP, MCKEON F. p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell.*, v. 129, p. 523-36, 2007.

SMITH RK. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disab. Rehabili.*, v. 30, p. 1752-1758, 2008.

TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v. 131, p. 861-872, 2007.

THOMASON JJ, MCCLINCHEY HL, FARAMARZI B, JOFRIET JC. Mechanical behavior and quantitative morphology of the equine lamellar junction. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, v. 283, p. 366-379, 2005.

THOMASON JJ, FARAMARZI B, REVILL A, SEARS W. Quantitative morphology of the equine lamellar junction in relation to capsule shape in the forehoof of Standardbreds and Thoroughbreds. *Eq. Vet. J.*, v. 40, p. 473-480, 2008.

WATTS AE, YEAGER AE, KOPYOV OV, NIXON AJ. Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem cell Res. Ther.*, v. 2, p. 4, 2011.

WEISS DJ, GEOR RJ, JOHNSTON G, TRENT AM. Microvascular thrombosis associated with onset of acute laminitis in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, v. 5, p. 606-612, 1994.

WHITE NA. Equine laminitis. The Waltham International Nutritional Science Symposium, Washington DC, September 14, 2005.

YANG A, KAGHAD M, WANG Y, GILLET E, FLEMING MD, DÖTSCH V, ANDREWS NC, CAPUT O, MCKEON F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell.*, v. 2, p. 305-316, 1998.