

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

Letícia de Oliveira Cota

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA, DISFUNÇÃO ORGÂNICA E  
LAMINITE INDUZIDAS POR OLIGOFRUTOSE EM EQUINOS SUPLEMENTADOS  
OU NÃO COM *LITHOTHAMNIUM MUELLERI***

Belo Horizonte

2021

Letícia de Oliveira Cota

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA, DISFUNÇÃO ORGÂNICA E  
LAMINITE INDUZIDAS POR OLIGOFRUTOSE EM EQUINOS SUPLEMENTADOS  
OU NÃO COM *LITHOTHAMNIUM MUELLERI***

**Versão final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Msc PhD Rafael Resende Faleiros

Belo Horizonte  
2021

C843r Cota, Leticia de Oliveira, 1994-  
Resposta inflamatória sistêmica, disfunção orgânica e laminite induzidas por oligofrutose em equinos suplementados ou não com *Lithothamnium Muelleri*/ Leticia de Oliveira Cota, -2021.

91 f.:il.

Orientador: Rafael Resende Faleiros  
Dissertação (Mestrado) Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Bibliografia: f.: 82 – 91.

1. equino – Doenças - Teses – 2. Sepsis - Teses – 3. Laminite - Teses – I. Faleiros, Rafael Resende - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA DE OLIVEIRA COTA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

Aprovado(a) em 15 de janeiro de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Dr.(a). Rafael Resende Faleiros - Presidente - Orientador(a)

Prof(a). Dr.(a). Geraldo Eleno Silveira Alves

Prof(a). Dr.(a). Fabiola de Oliveira Paes Leme

Prof(a). Dr.(a). Leonardo Rodrigues de Lima

Prof(a). Dr.(a). José Dantas Ribeiro Filho

Belo Horizonte, 15 de janeiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por Rafael Resende Faleiros, Professor do Magistério Superior, em 20/01/2021, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior, em 20/01/2021, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Geraldo Eleno Silveira Alves, Usuário Externo, em 25/01/2021, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por José Dantas Ribeiro Filho, Usuário Externo, em 25/01/2021, às 20:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Leonardo Rodrigues de Lima, Usuário Externo, em 12/02/2021, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0511186 e o código CRC 195CC7A9.

Dedico esta dissertação à Deus, aos meus pais Conceição de Oliveira Cota e Eloisio José Cota, aos meus irmãos Vinícius José Cota e Lara Alves Cota e ao meu grande amigo Jesus, pelo amor e apoio incondicionais.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser tão bom comigo! Por colocar as melhores pessoas do mundo no meu caminho e, principalmente, por sempre me surpreender com bênçãos e oportunidades que jamais pudesse imaginar. Por me dar força, paciência e muita saúde. A Jesus por estar em todos e em todo lugar, por ser paz e grande amigo.

A minha base! Obrigada mamãe e papai por amor, carinho, atenção, cuidados, preocupação, dedicação e sempre terem feito o melhor por mim. Obrigada por minha educação! Infinitamente obrigada! Agradeço ao Vi e a Bu, os melhores irmãos do mundo, que são meus grandes exemplos e meu suporte. Obrigada por estarmos juntos desde sempre, ao companheirismo, carinho, amizade e segurarem minha barra quando preciso.

A minha grande família! Maravilhosa!!! Em especial queria agradecer em memória aos meus avôs, e as minhas avós, que ainda estão aqui conosco enchendo nossos dias de animo e graça. Ao meu meio-irmão Tetinho e a Helinha, que fortalecem a minha base. Ao príncipe Benício, que é luz, graça e bondade, e a Valentina, os quais vieram alegrar e iluminar nossas vidas!

Aos meus velhos amigos, professores e famílias amigas de Cláudio, que sempre torceram e desejaram o meu melhor. Que amenizam com sua sabedoria, simplicidade e carinho a minha vida. Em especial ao meu padrinho Jorge do Bernadinho, que a 12 anos atrás me apresentou a um mundo do qual segui minha carreira, que com simplicidade, respeito, carinho e dedicação ensina e me ensinou. Obrigada! A família e aos grandes amigos que fiz e amizades que fortaleci no EJC de Cláudio. Obrigada por iluminar o meu caminho, pela força, compreensão, atenção e carinho.

A minha casa, a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram 9 anos de formação dos quais é imensurável a gratidão!

Ao meu orientador, o professor Rafael Faleiros, pesquisador, veterinário, cirurgião honorável. Gratidão por Deus ter colocado o senhor na minha vida, à paciência, ensinamentos, confiança, xingamentos, atenção, orientação e amizade. Só tenho a agradecer por 5 anos ao seu lado e a estes dois anos de mestrado, de orientação pesada. Espero ser um avos do senhor um dia.

A família EQUINOVA. Aos professores Rafael, Andressa e Armando, que se dedicam ativamente para a pesquisa e nossa orientação, e aos professores Geraldo Eleno e Valentim que sempre dedicaram a cirurgia de grandes da UFMG. Aos pós-graduandos, Patrícia, Mayara, Jéssica, Camilla, Isabella, Maria Luiza e, em especial, ao Antônio (Tony) que se tornou meu

grande amigo neste período, que com boas energias, conselhos, parceria e amizade me ajudou ativamente nos trabalhos. Aos pós-graduandos que passaram e contribuíram para meu crescimento e para a pesquisa e grupo EQUINOVA, Cahuê, Odael, Heloísa, Sérgio, Bruno, Ronaldo, e em especial quero agradecer ao Rodrigo Ribeiro pela oportunidade, confiança e amizade desde 2014, e ao Alvim pelos anos que trabalhamos juntos, amizade, carinho, atenção, cuidados, obrigada irmão de coração. A Heloísa, que sempre fará parte do grupo e que é uma grande guia, amiga e companheira. Aos alunos de iniciação científica, Marina Alcântara, Lucas, Marina Cunha, os quais dedicam com carinho ao EQUINOVA e dos quais me orgulho imensamente. Ao grupo de iniciação de 2015, Thairê, Rafael e Stéfanny, que deram o sangue por este trabalho. Aos residentes João e Lara, que com dedicação ajudam na pesquisa e contribuem para o time, e em especial a Jerusa, baiana que nos deu suporte no estudo, grande amiga e exemplo. Ao Carlos que se dedica e organiza com carinho o setor e torna nossos dias de trabalho mais descontraídos.

Ao seu João, o ser humano mais fantástico que já conheci, de sabedoria imensurável e que com coração cheio de alegria, carinho e felicidade me recebeu durante 4 anos em sua casa. Que me proporcionou conhecimento, amizades e crescimento pessoal que jamais tive. Seu João, o senhor é benção na minha vida!!! Obrigada pela amizade, atenção, dedicação e diversão! Aos bons amigos da casa Laurinha, Sid, Andrea, Marco Túlio, Fred e João Marcelo. Em especial quero agradecer aos meus grandes amigos, que merecem o mundo, e que admiro por demais, Tony e Helo. Infinitamente obrigada!

Aos animais, principalmente a todos que perderam a vida pelo bem da ciência. Em especial as éguas que contribuíram muito para o conhecimento da laminite equina, excepcionalmente a Lenda do HV. E a todos os animais que alegraram e alegram meus dias, em especialmente aqueles que cavalgam no céu!

“Só sei que nada sei” – Sócrates

“Novas terapias para sepse e SIRS funcionarão apenas se forem planejadas para ajudar o corpo a restaurar a homeostase e se administradas em um momento em que tal resultado é viável” –

Bone (1996)

## Resumo

Em equinos, o desequilíbrio da microbiota intestinal (disbiose) é causa comum de cólica, capaz de desencadear resposta inflamatória (sepsis), que se não controlada, pode evoluir para a disfunção dos órgãos, resultando em laminite grave e até óbito. O *Lithothamnium* spp. é uma alga marinha calcárea, que demonstrou propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes em estudos em animais de laboratório e humanos. Com a hipótese de que a ingestão prévia dessa alga reduz e retarda tais consequências, o objetivo foi avaliar os efeitos da suplementação com *Lithothamnium muelleri* na resposta inflamatória sistêmica, na disfunção orgânica e no casco em equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose. Foram utilizados 12 equinos hípidos, divididos em grupos controle e tratado. O grupo tratado recebeu *Lithothamnium muelleri* (100 mg/kg PO BID), durante seis dias antes e nas 36 horas após indução de disbiose e laminite por sobrecarga de oligofrutose (1g/kg PO durante 3 dias; e indução com 10g/kg PO no quarto dia). Os animais foram avaliados clinicamente e laboratorialmente antes e nos tempos 0, 6, 12, 18 e 24 horas subsequentes à indução. Biópsias de casco foram realizadas nos tempos 0, 12 e 36 horas após a indução, para avaliação histológica e imunomarcagem de calprotectina (CP+). Os dados paramétricos foram submetidos a ANOVA em blocos ao acaso, seguida pelos testes de Tukey e T de Student. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Friedman, seguidos pelos testes de Dunn's e Mann-Whitney. Os dois grupos apresentaram inflamação sistêmica, disfunção orgânica e consequente laminite. Contudo, no grupo tratado as alterações ocorreram de forma mais amena e tardia. Em conclusão a ingestão prévia de *L. muelleri* foi capaz de amenizar e retardar o início do quadro séptico, disfunção de órgãos e laminite em equinos submetidos a modelo de sobrecarga de oligofrutose. Apesar de preliminares, os achados demonstram o potencial da suplementação oral com *Lithothamnium muelleri* para controle da resposta inflamatória sistêmica frente a uma disbiose intestinal em equinos.

Palavras-chave: Algas marinhas. Anti-inflamatório. Cavalos. Inflamação. Laminite.

## Abstract

In horses, intestinal microbiota imbalance (dysbiosis) is a common cause of colic, capable of triggering an inflammatory response (sepsis), which, if not controlled, can progress to organ dysfunction, resulting in severe laminitis and even death. *Lithothamnium* spp. is a calcareous kelp, which has demonstrated anti-inflammatory and antioxidant properties in studies in laboratory animals and humans. With the hypothesis that the previous ingestion of this alga reduces and delays such consequences, the objective was to evaluate the effects of supplementation with *Lithothamnium muelleri* on the systemic inflammatory response, on organ dysfunction and on the hoof in horses submitted to the oligofructose laminitis model. Twelve healthy horses were used, divided into control and treated groups. The treated group received *Lithothamnium muelleri* (100 mg / kg PO BID) for six days before and in the 36 hours after induction of dysbiosis and laminitis due to oligofructose overload (1g / kg PO for 3 days; and induction with 10g / kg PO in the fourth day). The animals were evaluated clinically and laboratory before and at times 0, 6, 12, 18 and 24 hours after induction. Hoof biopsies were performed at times 0, 12 and 36 hours after induction, for histological evaluation and immunostaining of calprotectin (CP +). The parametric data were evaluated to ANOVA in randomized blocks, followed by the Tukey and Student's T tests. Nonparametric data were analyzed using the Friedman test, followed by the Dunn's and Mann-Whitney tests. Both groups had systemic inflammation, organ dysfunction and consequent laminitis. However, in the treated group, the changes occurred more mildly and later. In conclusion, the previous ingestion of *L. muelleri* was able to alleviate and delay the onset of septic conditions, organ dysfunction and laminitis in horses submitted to an oligofructose overload model. Although preliminary, the findings demonstrate the potential of oral supplementation with *Lithothamnium muelleri* to control the systemic inflammatory response to intestinal dysbiosis in horses.

Keywords: Anti-inflammatory. Horse. Inflammation. Laminitis. Seaweed.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Aspecto proximal da parede dorsal do casco de cavalo adulto normal vista da superfície interna. Observam-se as subdivisões do estojo córneo em extratos externo, médio e interno. Adaptado de Pollitt (2016a). Página 20.

**Figura 2:** Diagrama dos feixes de colágeno do aparelho suspensor da falange distal (ASFD) na região lamelar dorsal. Os feixes de colágeno são fixos a superfície parietal da falange distal e cruzam a derme sublamelar para inserir como filamentos na membrana basal lamelar. Adaptado de Pollitt (2016b). Página 21.

**Figura 3:** Diagrama das lamelas epidérmicas secundárias (a esquerda), das células epidérmicas basais lamelares (CEBL) (a direita) e seu citoesqueleto, como parte integrante do aparato suspensor da falange distal (ASFD). Adaptado de Pollitt (2016b, 2016c). Página 22.

**Figura 4:** Diagrama do provável papel do sistema imune lamelar em casos de laminite relacionada à sepsé (LRS). Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), absorvidos do insulto primário, circulam no organismo e alcançam o tecido lamelar. As células residentes na derme lamelar e os queratinócitos são ativados, promovem a sinalização inflamatória e, conseqüente, rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio. Macrófagos residentes, também podem secretar metaloproteinases (MMPs), que degradam a matriz extracelular. Adaptado de Faleiros e Belknap (2017). Página 27.

**Figura 5:** Fotomicrografias de tecido laminar de cavalos com laminite induzida por extrato de noqueira preta (BWE), mostrando a imunolocalização da calprotectina (vermelho) nos grupos: controle (CON), 1,5 horas após BWE (ETP), no início da fase de desenvolvimento (DTP, 3-4 horas após BWE) e no início da claudicação (LAM, 10-12 horas após o BWE). Observa-se um número crescente de leucócitos perivascularres no tecido laminar (começando em ETP, setas pretas), e ao redor dos vasos da derme profunda em momentos posteriores (começando em DTP, setas amarelas). A expressão epidérmica intensa de calprotectina é observada no LAM (setas azuis) em comparação com a coloração insignificante no CON ou mesmo ETP e DTP (setas azuis), indicando que a migração leucocitária induziu inflamação na epiderme. Barras de escala com 240 µm. Adaptado de Faleiros et al., 2009. Página 28.

**Figura 6:** Fluxograma do fornecimento de *Lithothamnium muelleri*, protocolo de indução de laminite, exame clínico, hemograma, bioquímico, biópsia e necropsia de equinos sobrecarregados com carboidratos. Página 36.

**Figura 7:** Sequência fotográfica de procedimentos de biópsia lamelar com o lamelótomo de Falcão-Faleiros mostrando a demarcação do local da biópsia (A-B), o desbaste do tecido queratinizado com um cortador plano ligado a uma ferramenta elétrica rotativa (C-D), a incisão das margens internas com um bisturi (E), a inserção (F-G) e o avanço do lamelótomo. Aspecto da ferida cirúrgica (H) e da amostra (I) (Ribeiro et al., 2016). Página 41.

**Figura 8:** Fotomicrografia das lamelas epidérmicas secundárias (LES) com lesões promovidas por laminite induzida por oligofrutose, corte transversal da junção lamelar dorsal. A membrana basal (MB) é destacada pelo ácido periódico de Schiff (PAS) (setas brancas). **A:** Histopatologia de lesões lamelares de grau 4 (Grau Pollitt 1). As LES estão alongadas e finas e ápice em forma de taco. Os núcleos das células basais estão arredondados e anormalmente posicionados próximos a MB. Bolhas em forma de teta se formam na MB no ápice da LES (pontas de seta). A BM lamelar ainda está presente nas pontas das LDS. O diâmetro aumentado dos capilares sugere vasodilatação. **B:** Histopatologia de lesões lamelares de grau 5 (Grau Pollitt 2). A MB encontrava-se mais solta e destacada e forma filamentos de

duas camadas (pontas de seta). A MB não está mais presente na ponta das LDS, entre as bases das LES. As células basais epidérmicas, sem a influência de uma membrana basal intacta e funcional, começam a se fundir em uma massa não estruturada com função suspensora comprometida (asteriscos). **C:** Histopatologia de lesões lamelares de grau 6 (Grau Pollitt 3). Os filamentos estirados de dupla camada do BM (pontas de seta) são mais longos. Praticamente toda a MB foi retirada de cada LES e foi realocado para as bordas da LDP. As LDS são desprovidas de MB, e praticamente todas as células epidérmicas lamelares coalesceram em uma massa não estruturada e multicelular (asteriscos). Adaptado de Pollitt (2016c). Página 44.

**Figura 9:** Fotomicrografias da imunomarcagem de calprotectina nas lamelas epidérmicas secundárias (LES) em laminite induzida por oligofrutose, corte transversal da junção lamelar dorsal. A marcação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) em marrom. **A:** Escore 0, não é observada marcação de calprotectina na LES. **B:** Escore 1, marcação pontual de calprotectina na LES. **C:** Escore 2, marcação de calprotectina em até 25% das LES. **D:** Escore 3, marcação de calprotectina entre 25 e 50% das LES. **E:** Escore 4, marcação de calprotectina entre 50 e 75% das LES. **F:** Escore 6, marcação de calprotectina em mais de 75% das LES. Página 45.

**Figura 10:** Médias  $\pm$  erros padrão das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asteriscos indicam diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. # P=0,0009; \* P<0,0254. Página 49.

**Figura 11:** Médias  $\pm$  erros padrão da temperatura retal (TR) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asteriscos indicam diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. \* P=0,0126. Página 52.

**Figura 12:** Médias  $\pm$  erros padrão do número de hemácias, concentração plasmática de hemoglobina, hematócrito (VG) e proteína plasmática total (PPT) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Um asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. PPT: Friedman test seguido de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,02; \* P<0,0349. Página 54.

**Figura 13:** Médias  $\pm$  erros padrão da contagem de plaquetas e fibrinogênio de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Hashtags indicam diferença entre grupos. Plaquetas: Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. Fibrinogênio: Friedman test seguido de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,0216. Página 55.

**Figura 14:** Médias  $\pm$  erros padrão da contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, bastonetes totais e classificação de toxicidade de neutrófilos (0: ausência de neutrófilos tóxicos; 1: presença considerável; 2: moderada; 3: intensa de neutrófilos tóxicos) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos.

Teste de Normalidade, Ordinary one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. Para basófilos Kruskal-Wallis test, e para intensidade de neutrófilos tóxicos Friedman test, seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,04; \* P<0,02. Página 57.

**Figura 15:** Médias  $\pm$  erros padrão da relação neutrófilo:linfócito de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, Ordinary one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. # P<0,04; \* P<0,04. Página 58.

**Figura 16:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase (GGT) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. AST: Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. ALT, FA e GGT: Friedman test, seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,0260; \* P<0,0004. Página 61.

**Figura 17:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de bilirrubina total, direta e indireta, de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. # P<0,0470; \* P<0,0207. Página 63.

**Figura 18:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de ureia e creatinina de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. \* P<0,03. Página 65.

**Figura 19:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de albumina, globulina e proteína total (PT) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. # P<0,03; \* P<0,04. Página 67.

**Figura 20:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de glicose de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. # P<0,0040; \* P<0,0011. Página 68.

**Figura 21:** Médias  $\pm$  erros padrão do grau de laminite segundo Obel (1948) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul

o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asteriscos indicam diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Friedman test seguido de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,0216; \* P<0,0191. Página 70.

**Figura 22:** Médias  $\pm$  erros padrão do escore de lesão lamelar de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, Kruskal-Wallis test seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,04; \* P<0,05. grupos. Teste de Normalidade, Kruskal-Wallis test seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,04; \* P<0,05. Página 71.

**Figura 23:** Fotomicrografia da seção transversal da parede dorsal das lamelas epidérmicas primárias e secundárias de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. CON: grupo controle. LITHO: grupo tratado com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Os tecidos são corados com ácido periódico - reagente de Schiff (PAS) para destacar a MB. Na **histologia basal** as LEP e LES são observadas em formato padrão, estando as LES pontualmente alongadas. As CEBL com núcleo em sua maioria oval, centralizado e com eixo perpendicular a MB. A MB conexa entre as LES e LDS com pontuais enrugamentos (seta preta). No **T12**, é observado a maioria dos núcleos da CEBL arredondados e no CON as LES e LEP em sua maioria alongadas e algumas LES com pontas afiladas. No **CON T36**, quase a totalidade dos núcleos das CEBL estavam arredondados, posicionados próximos e paralelamente à MB. As LES e LEP em maioria estavam alongadas e algumas LES afiladas. O desprendimento da MB em forma de “teta” (seta vermelha) e severo enrugamento foram ainda observados. No **LITHO T36**, apesar da maioria dos núcleos das CEBL estarem arredondados, a estruturação celular se manteve normal, com posicionamento do núcleo centralizado e perpendicular a MB, maioritariamente. Alongamento das LES também foi evidente. Aumento das fotomicrografias 10X e 40X. Página 72.

**Figura 24:** Médias  $\pm$  erros padrão da expressão e intensidade de expressão da imunomarcção de calprotectina nas células epidérmicas basais e incidência e localização de leucócitos nas lamelas dérmicas dorsais do casco de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, Kruskal-Wallis test seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,04; \* P<0,05. Página 76.

**Figura 25:** Fotomicrografia da seção transversal da parede dorsal das lamelas epidérmicas primárias e secundárias de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. CON: grupo controle. LITHO: grupo tratado com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Os tecidos são imunomarcados para calprotectina. Verifica-se ausência de células calprotectina positivas (CP+) nas amostras basais. No **CON T12** é observada presença considerável de CEBL CP+ com moderada intensidade de imunomarcção. No **LITHO T12**, pontual marcação de queratinócitos CP+ é identificado. No **T36** entanto, a distribuição de CEBL CP+ no LITHO se igualou à observada no CON. Aumento das fotomicrografias 10X e 40X. Página 77.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Visão geral dos mecanismos fisiopatológicos propostos de laminite aguda nos diferentes modelos de laminite. Adaptado de Katz e Bailey (2012) e Van Eps e Burns (2019). Página 23.

**Tabela 2:** Grau AAEP de claudicação em equinos. Página 38.

**Tabela 3:** Grau Obel de laminite em equinos (Obel, 1948). Página 38.

**Tabela 4:** Critérios de diagnóstico para SIRS/sepsse em cavalos adultos (Barton e Peroni, 2018). Página 40.

**Tabela 5:** Escores de lesões microscópicas em amostras de tecido lamelar de equinos, coradas com PAS (Faleiros et al., 2011). Página 43.

**Tabela 6:** Escore de marcação de calprotectina por imuno-histoquímica nas lâminas epidérmicas secundárias de equinos (Faleiros et al., 2009). Página 45.

**Tabela 7:** Escore de marcação de neutrófilos e macrófagos ativados nas lâminas epidérmicas secundárias de equinos (Laskoski et al., 2015). Página 46.

**Tabela 8:** Classificação da consistência das fezes e escore de motilidade intestinal geral dos equinos submetidos a sobrecarga de oligofrutose (10g/kg) controle e tratados com *Lithothamnium muelleri* (100mg/kg PO BID, previamente durante 7 dias). Página 47.

**Tabela 9:** Coloração de mucosas e tempo de preenchimento capilar de equinos submetidos a sobrecarga de oligofrutose (10g/kg) controle e tratados com *Lithothamnium muelleri* (100mg/kg PO BID, previamente durante 7 dias). Página 49.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais	LITHO – Grupo <i>Lithothamnium</i>
AC – Antes de cristo	LRS – Laminite relacionada à seps
ALB – Albumina	LDP – Lamelas dérmicas primárias
AST - Aspartato aminotransferase	LDS – Lamelas dérmicas secundárias
ALT - Alanina aminotransferase	LEP – Lamelas epidérmicas primárias
ASFD – Aparato suspensor da falange distal	LES – Lamelas epidérmicas secundárias
BWE – Extrato de noqueira preta	MODS – Disfunção de múltiplos órgãos
BPM – Batimentos por minuto	MB – Membrana basal
BID – A cada 12 horas	MMP – Metaloproteinases de matriz
BT - Bilirrubina total	MRM – Movimentos respiratórios por minuto
BD - Bilirrubina direta	NT – Neutrófilo Tóxico
BI – Bilirrubina indireta	NH <sub>3</sub> – Amônia
CP – Calprotectina	OF – Oligofrutose
CEBL – Células epidérmicas basais lamelares	OA – Osteoartrite
CHO – Carboidratos	PT – Proteína total
CON – Grupo controle	PAS - Ácido periódico de shiff
DAMPs – Padrões moleculares relacionados ao dano	PAMPs – Padrões moleculares relacionados ao patógeno
EHSS – Equine hindgut streptococcal species (Espécies estreptocócicas do intestino grosso dos equinos)	PO – Via oral
FC - Frequência cardíaca	PSS – Polissacarídeos sulfatados
FR – Frequência respiratória	PPRs- Receptores de reconhecimento padrão
FD – Falange distal	PT – Proteína total
FA - Fosfatase alcalina	RPM – Rotações por minuto
FIB – Fibrinogênio	SID – A cada 24 horas
GLO – Globulina	SISR - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
GGT - Gama glutamiltranspeptidase	TLR – Receptores tipo Toll-like
GVHD - doença do enxerto contra o hospedeiro	TR - Temperatura retal
HIF-1 $\alpha$ – Fator induzível por hipóxia	T0 – Tempo 0 horas antes da indução (Basal)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - Bicarbonato	T6 – Tempo 6 horas após a indução
HE -Hematoxilina e eosina	T12 – Tempo 12 horas após a indução
IG – Intestino grosso	T18 - Tempo 18 horas após a indução
IFG-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I	T36 – Tempo 36 horas após a indução
IL – Interleucina	TGI – Trato gastrointestinal
ID -Intestino Delgado	TNF – Fator de necrose tumoral
LD – Lamelas dérmicas	TPC – Tempo de preenchimento capilar
	VG – Volume Globular (Hematócrito)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
<b>2.1. Estrutura do casco</b>	20
<b>2.2. Causas de laminite</b>	22
<b>2.3. Modelos de indução de laminite</b>	23
2.3.1. Modelo de laminite por sobrecarga de oligofrutose	24
<b>2.4. Laminite relacionada à sepse</b>	25
2.4.1. Fisiopatogenia e epidemiologia	25
2.4.2. Eventos da Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/Sepse	26
2.4.3. Eventos inflamatórios nas lamelas dérmicas	27
<b>2.5. Apresentação clínica da laminite relacionada à sepse</b>	29
<b>2.6. Terapias e prevenção direcionadas a laminite relacionada à sepse</b>	29
<b>2.7. <i>Lithothamnium</i> spp.</b>	31
2.7.1. Componentes e efeitos do <i>Lithothamnium</i> spp.	32
2.7.2. Toxicidade do <i>Lithothamnium</i> spp.	33
2.7.3. Protocolos de utilização de <i>Lithothamnium</i> spp.	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	35
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	47
<b>5. CONCLUSÃO</b>	79
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	79
<b>7. PERSPECTIVAS PARA EXPERIMENTOS FUTUROS</b>	80
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	82

## 1. INTRODUÇÃO

A laminite é uma doença historicamente descrita como uma condição inflamatória do casco dos cavalos que pode resultar na deformação ou perda dos cascos. Apesar dos sintomas serem mais evidentes nos membros torácicos, o que faz o equino acometido assumir uma postura típica de deslocamento de sua massa corpórea para os pélvicos, essa enfermidade, excetuando casos de traumas localizados, se desenvolve normalmente nos quatro membros dos equinos. Registros gregos fornecem indícios da ocorrência de laminite desde 350 aC, quando Aristóteles descreveu quadros febris agudos e danos aos cascos associados à ingestão de cevada. Já Apsyrtus, em 330 aC, que se referia à laminite como “gota”, determinou que se tratava de uma doença multifatorial e recomendava a sangria, exercícios leves e a restrição alimentar para o tratamento (Wagner e Heymering, 1999). Apesar de dois milênios desde as primeiras referências, a laminite continua sendo um desafio para médicos veterinários, ferradores e cavaleiros, devido à sua complexa fisiopatologia e necessidade de terapia multimodal (Belknap, 2017).

Tal complexidade se dá, pois o casco é uma porção do tegumento altamente especializada nos equinos para sustentação do peso e dissipação das forças de reação do solo. A conexão do casco com o esqueleto apendicular é feita pelo aparato suspensor da falange distal (ASFD), sendo que a laminite resulta na falha estrutural e funcional dessa estrutura (Pollitt, 2004). Tal condição compromete não só a utilização e a carreira dos cavalos, mas principalmente, o bem-estar dos animais acometidos, promovendo perdas financeiras e emocionais significativas a todos os envolvidos (Walsh e Burns, 2017).

Dentre as causas mais comuns de laminite, a relacionada aos quadros de sepse, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e disfunção de múltiplos órgãos (MODS) é a mais desafiadora, devido à sua evolução rápida e consequências drásticas. Comumente essas condições estão associadas a doenças do trato gastrointestinal (TGI), pneumonia e metrite (Annane et al., 2005; Manson et al, 2012). O tratamento da laminite relacionada à sepse (LRS) se baseia na terapêutica da causa primária, e no controle da resposta inflamatória sistêmica, no suporte hidroeletrólítico e no estabelecimento precoce da crioterapia nos dígitos. Contudo, inúmeros fatores, como peso, raça, idade, intensidade do insulto primário, distúrbios endócrinopáticos prévios, imunocompetência, entre outros, influenciam na susceptibilidade e no grau de lesão lamelar. Por isso a terapêutica da laminite pode ser tão desafiadora.

O *Lithothamnium* spp. é uma alga marinha calcárea, classificada como composto bioativo, com potencial anti-inflamatório, antioxidante e imunomodulador. Vários estudos realizados em humanos e animais de laboratório têm demonstrado que seu uso foi capaz de inibir o rolamento de leucócitos induzido por LPS (Soares et al., 2012), reduzir a reabsorção óssea e inflamação periodontal em ratos (Taddei et al., 2014), reduzir a dor e a rigidez articular em humanos com osteoartrite grave (Frested et al., 2008; Frested et al., 2009) e em camundongos com artrite (Costa et al., 2015). Mais além, existem relatos da supressão de pólipos e redução da inflamação intestinal em ratos em dieta com alta gordura (Aslam et al., 2010) e da prevenção do desenvolvimento da doença clínica e de mortalidade associada à doença do enxerto contra o hospedeiro em ratos transplantados com células halogênicas (Rezende et al., 2013).

O grupo EQUINOVA vem estudando terapias diversas para prevenir o infiltrado leucocitário e danos no tecido lamelar (Lima, 2012; Junior, 2017) e promover melhorias biomecânicas (Paz, 2018) e a melhora do tecido cicatricial (Oliveira, 2019) no ASFD em equinos com LRS.

### **1.1. Hipótese e objetivos**

Tendo em vista o potencial anti-inflamatório do *Lithothamnium* spp. em outras espécies, a hipótese do presente estudo é que a suplementação da dieta com *Lithothamnium muelleri* apresenta efeito anti-inflamatório capaz de reduzir e retardar a resposta inflamatória sistêmica exacerbada, a disfunção de órgãos e as lesões na junção dermo-epidérmica do casco dos cavalos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose.

O objetivo principal foi de avaliar os efeitos do *Lithothamnium muelleri* no desenvolvimento do quadro séptico e nas lesões de casco em equinos com laminite induzida por oligofrutose. Os objetivos específicos foram avaliar e comparar alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e do tecido lamelar de equinos submetidos a laminite relacionada à sepse suplementados ou não por *Lithothamnium* spp.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Estrutura do casco

O casco é uma porção altamente especializada do tegumento, que foi adaptada para sustentação de peso e dissipação de forças de reação do solo. O tegumento é composto pela hipoderme (subcutâneo), derme e epiderme. A hipoderme faz a conexão da derme à falange distal adjacente, que na rasilha forma uma estrutura especializada, o coxim digital.

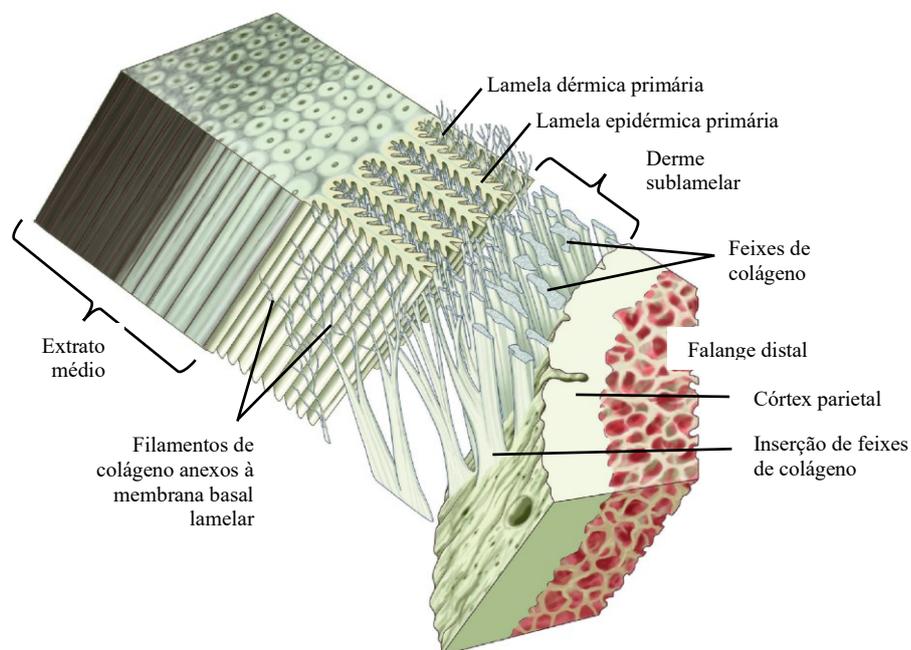
A derme é a porção do tegumento altamente vascularizada e inervada, que se dobra na derme parietal, formando as lamelas dérmicas primárias (LDP). Nos equídeos existe adicionalmente dobras na superfície das lamelas primárias, denominadas lamelas dérmicas secundárias (LDS). Normalmente, há aproximadamente de 550-600 LDP por casco e 150-200 LDS para cada LDP, que fazem interdigitações com as lamelas epidérmicas primárias e secundárias, respectivamente (Pollitt, 2004).

A epiderme se constitui no estojo córneo, que é subdividido em estrato externo, estrato médio (porção tubular), e estrato interno ou lamelar (Figura1), sendo esse constituído pelas lamelas epidérmicas primárias (LEP) e secundárias (LES) (Goetz, 1987). O estrato externo deriva do cório perióplo e o estrato médio da borda coronária (Konig e Liebith, 2009), sendo que ambos crescem no sentido distal (Parks, 2017).

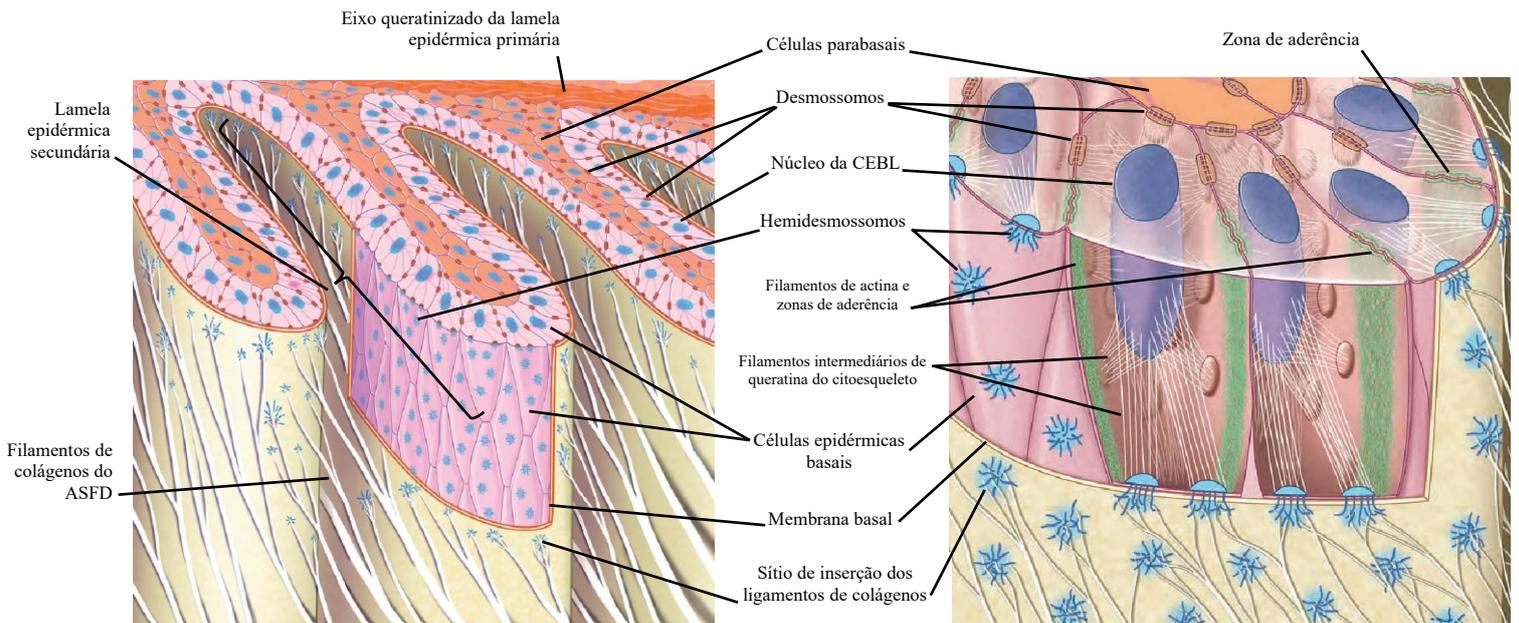


**Figura 1:** Aspecto proximal da parede dorsal do casco de cavalo adulto normal vista da superfície interna. Observam-se as subdivisões do estojo córneo em extratos externo, médio e interno. Adaptado de Pollitt (2016a).

O ASFD é o anexo que conecta a FD à superfície interna da cápsula do casco. Feixes de colágeno fortemente fixos ao córtex parietal da FD cruzam de forma alinhada a derme, e inserem na membrana basal (MB) das células epiteliais basais lamelares (CEBL) como finos ligamentos de colágeno (Figura2). Como parte integrante do ASFD, estão as CEBL e seu citoesqueleto, que mantém fixação à MB, as CEBL vizinhas e as células parabasais da LES, por meio de hemidesmossomos, desmossomos e zonas de adesão (Figura3). A ruptura dos anexos suspensivos da FD decorrente da laminite, variavelmente cursa com rotação e afundamento da FD, o que incapacita e gera dor severa aos cavalos (Budras et al., 2009a; Budras et al., 2009b; Pollitt, 2016b).



**Figura 2:** Diagrama dos feixes de colágeno do aparelho suspensor da falange distal (ASFD) na região lamelar dorsal. Os feixes de colágeno são fixos a superfície parietal da falange distal e cruzam a derme sublamelar para inserir como filamentos na membrana basal lamelar. Adaptado de Pollitt (2016b).



**Figura 3:** Diagrama das lamelas epidérmicas secundárias (a esquerda), das células epidérmicas basais lamelares (CEBL) (a direita) e seu citoesqueleto, como parte integrante do aparato suspensor da falange distal (ASFD). Adaptado de Pollitt (2016b, 2016c).

## 2.2. Causas de laminite

O termo laminite descreve a consequência clínica e patológica de doenças que culminam na falha do ASFD. As pesquisas das últimas décadas ampliaram a compreensão da fisiopatogenia da laminite e permitiram diferenciar as situações clínicas em que ela ocorre. Atualmente as principais formas de laminite são a relacionada à sepse, a endocrinopática, e a de sobrecarga mecânica. A laminite relacionada à sepse (LRS) transcorre de doenças que cursam com processos inflamatórios sistêmicos, e será discutida adiante. A laminite endocrinopática está associada à desregulação da insulina, primária à síndrome metabólica equina, associada à disfunção hipofisária da pars intermédia ou secundária à administração de corticosteróides. A laminite por sobrecarga mecânica ocorre em condições dolorosas de um membro, como fratura e infecções sinoviais, em que o membro contralateral é sobrecarregado. Apesar das diferenças fisiopatológicas dos eventos desencadeantes, há uma convergência e progressão para desconexão do epitélio lamelar e estiramento celular, mecanismos característicos da falha do ASFD na laminite aguda (Van Eps e Burns, 2019).

A integridade estrutural das lamelas parece depender da manutenção do citoesqueleto celular e da conexão entres as CEBL e dessas com a derme subjacente. Dessa forma, entende-se que a falência estrutural ocorre quando as forças de estiramento entre o estojo córneo e a falange

distal, ocasionadas pela massa corpórea e a força de reação do solo, superam a resistência do ASFD, progressivamente enfraquecida por tais alterações celulares (Belknap, 2017). Portanto, a evolução da laminite depende da gravidade e extensão do dano tecidual e do somatório de forças que atuam no aparato suspensor (Van Eps e Burns, 2019).

### 2.3. Modelos de indução de laminite

Diferentes condições culminam na falha estrutural do ASFD e modelos de indução de laminite permitem a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos (Tabela 1).

**Tabela 1:** Visão geral dos mecanismos fisiopatológicos propostos de laminite aguda nos diferentes modelos de laminite. Adaptado de Katz e Bailey (2012) e Van Eps e Burns (2019).

Modelo usado para induzir laminite	Laminite	Fisiopatologia proposta	Duração do desenvolvimento e primeiras mudanças laminares	Atividade enzimática e leucocitária	Limitações	Referências
Sobrecarga de Amido	Relacionada à sepse	Carboidratos não estruturais chegam ao IG, promovendo disbiose, redução do pH luminal, e consequentemente, irritação e dano a mucosa intestinal e absorção de produtos microbianos	24-40hs, ocorre perda da forma e arranjo das CEBL e desconexão da MB	Infiltração leucocitária lamelar em 32–72 h. MMP-2 e MMP-9 aumentam durante a fase aguda. Expressão gênica de ADAMTS-4 aumenta	Alta incidência de cólica e mortalidade.	Pollitt (1996); Pollitt e Daradka (1998); Johnson et al. (1998); Faleiros et al. (2011).
Sobrecarga de Oligofrutos e			24-36 hs, ocorre perda da forma e arranjo das CEBL e desconexão MB	Infiltração leucocitária lamelar na fase aguda. MMP-14 aumenta durante a fase aguda.	Simula situações extremas de laminite resultante da ingestão de pastagens exuberantes.	Van Eps e Pollitt (2006); Nourian et al. (2007).
Extrato de Nogueira Preta		Agente desconhecido; provável molécula que ativa PPRs.	8-12 hs, ocorre perda da forma e arranjo das CEBL e desconexão MB	Genes inflamatórios regulados positivamente em 1,5 hs. Citocinas pró-inflamatórias aumentadas em 3 hs. Infiltração leucocitária lamelar durante a fase de desenvolvimento.	Não mimetiza a laminite causada pelo excesso de CHO na dieta.	Minnick et al. (1987); Galey et al. (1991); Black et al. (2006); Faleiros et al. (2009).

<b>Clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico</b>	Endocrinopática	Hiperinsulinemia; ação sobre receptores IGF-1?	48 hs, ocorre alongamento das LES, mudança de forma dos núcleos da CEBL e desconexão da MB da ponta das LES	Atividade mínima de MMP. Mínimo infiltrado e ativação de leucócitos.	Desenvolve laminite grave e aguda, portanto, não mimetiza a laminite endocrinopática de ocorrência natural.	De Laat et al. (2010); Asplin et al. (2010).
<b>Infusão de glicose</b>		Desenvolvimento de hiperinsulinemia; ação sobre receptores IGF-1?	48hs, ausência de claudicação, mas alongamento das LES e perda da MB da base das LES	Infiltrado mínimo de leucócitos.	Não mimetiza a laminite endocrinopática de ocorrência natural.	De Laat et al. (2012).
<b>Dieta de alto CNE para cavalos com desregulação de insulina</b>		DI por PPID e SME acentuada; ação sobre receptores IGF-1?	18 dias, laminite clínica e rotação da falange distal	Não avaliado.	Pode não mimetizar a laminite aguda associada a pastagens, devido às diferenças entre os componentes da dieta.	Meier et al. (2018).
<b>Suporte de peso</b>	Sobrecarga mecânica	Sobrecarga mecânica, levando a provável congestão e estase no dígito; hipóxia lamelar?	Não descrito	Resposta inflamatória mínima no início do processo. Em 48hs, aumento do fator induzível por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ )	Carece de elementos presentes nas condições clínicas em que ocorre, como dor, estresse e inflamação secundária ao dano tecidual ou infecção.	Baxter e Morrison (2008); Belknap (2008); Gardner et al. (2017).

IG – Intestino grosso, PPRs- Receptores de reconhecimento padrão, IFG-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I, DI – Disfunção insulínica, PPID - Disfunção da pars intermédia da pituitária, SME – Síndrome metabólica equina, CEBL – Células epidérmicas basais lamelares, MB – membrana basal, MMP – metaloproteinases de matriz

### 2.3.1. Modelo de laminite por sobrecarga de oligofrutose

O amido, juntamente com os frutanos, são os principais CHO não estruturais de armazenamento de gramíneas de regiões temperadas. Em regiões com clima ideal, as gramíneas podem acumular até 50% do teor de matéria seca em frutano (Cairns e Longland, 1998). O modelo de laminite por sobrecarga de oligofrutose (OF) simula a laminite resultante da ingestão de pastagem exuberante (French e Pollitt, 2004). A OF é um oligossacarídeo retirado da raiz de chicória, que contém resíduos de monossacarídeo conectados por glicosídeos, com cadeia terminais de  $\beta$ -(2-1) frutose. As ligações  $\beta$ -(2-1) evitam a hidrólise e digestão no TGI superior

dos monogástricos. Assim, a OF chega no IG totalmente disponível para a fermentação em ácidos graxos de cadeia curta por bactérias do intestino grosso (Flickinger et al., 2003).

O protocolo de indução de laminite por sobrecarga de OF mimetiza o consumo diário máximo que poderia ocorrer em regiões com boa produção de frutanos. As doses de 7,5, 10 e 12,5 mg/kg foram testadas, sendo observado em todos os animais o desenvolvimento de quadro séptico e laminite na dose de 10g/kg de OF. A incidência de choque séptico hipovolêmico pode ser reduzida por aclimação prévia à dieta com CHO solúveis por três semanas (French e Pollitt, 2004; Van Eps e Pollitt, 2006).

A OF é usada como substrato e desencadeia uma rápida proliferação de bactérias gram-positivas (*Streptococcus bovis*, *Streptococcus lutetiensis*), com produção de ácido láctico e brusca redução de pH (Milinovich et al., 2006; Milinovich et al., 2007; Milinovich et al., 2008). Além disso, alterações degenerativas importantes na mucosa cecal e colônica são desencadeadas, resultando na perda da barreira seletiva das células epiteliais intestinais (Krueger et al., 1986; Weiss et al., 1998) e diarreia profusa é observada (Van Eps e Pollitt, 2006).

## **2.4. Laminite relacionada à sepse**

### **2.4.1. Fisiopatogenia e epidemiologia**

A laminite aguda pode ser consequência grave de inúmeras causas de sepse em equinos. A sepse é um estado de inflamação sistêmica associada a uma infecção evidente. A sepse em equinos decorre de diversas circunstâncias como metrite, bronco e pleuropneumonia e de disbiose ou condições desvitalizantes no trato gastrointestinal (TGI), que incluem duodenite/jejunité proximal, enterocolite, sobrecarga de grão e obstruções estrangulantes (Annane et al., 2005). Apesar da laminite ser uma das complicações mais significativas dessas causas, sua incidência não é ainda bem conhecida.

Estudos e revisões mostram a ocorrência de laminite variando entre 2% e 4% em doenças intestinais (Munoz et al., 2008; Rebiere, 2009) e cerca 11% em casos de diarreia aguda (Cohen e Woods, 1999). De toda forma, a doença do TGI é provavelmente a causa mais comum de laminite relacionada à sepse (LRS). Um estudo epidemiológico verificou que a laminite tinha como causa primária doenças do TGI em 54% dos casos, com correlação positiva com a

intensidade dos quadros (Slater et al., 1995). Outros estudos relatam a cólica cirúrgica (Hunt et al., 1986), a diarreia aguda (Cohen e Woods, 1999) e a duodenojejunité proximal (Cohen, 1994) como associadas a maior risco de ocorrência da laminite aguda.

Além disso, a laminite pode estar associada a miopatias agudas, principalmente quando acompanhada de lesão renal. Nesses casos, a ruptura da membrana celular promove liberação de componentes intracelulares, que podem atuar como padrões moleculares associadas ao dano (DAMPs). Tais moléculas são reconhecidas por receptores de membrana que desencadeiam uma sinalização inflamatória para fagocitose de células mortas e reparação tecidual. A circulação de produtos de tecidos lesionados e células mortas pode promover processo inflamatório em outros órgãos, incluindo a lamela dermal, o que provavelmente desencadeia a laminite nestes casos (Manson et al., 2012).

#### 2.4.2. Eventos da Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/Sepse

A resposta inflamatória observada nos modelos de indução de laminite por sobrecarga de carboidrato (CHO) e extrato de noqueira preta (BWE) se assemelham à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)/sepsé humana (Belknap et al., 2009). Normalmente um trauma local ou infecção não controlados, resultam na absorção sanguínea de moléculas, organismos infecciosos e/ou detritos celulares. O reconhecimento de microrganismos invasores e de danos teciduais ocorre pela identificação de moléculas específicas/padrões que se ligam e ativam receptores de reconhecimento padrão (PPRs), como os receptores do tipo Toll-like (TLR) e Nod, presentes em quase todas as células do organismo e que desencadeiam a sinalização inflamatória (Hirsiger et al., 2012).

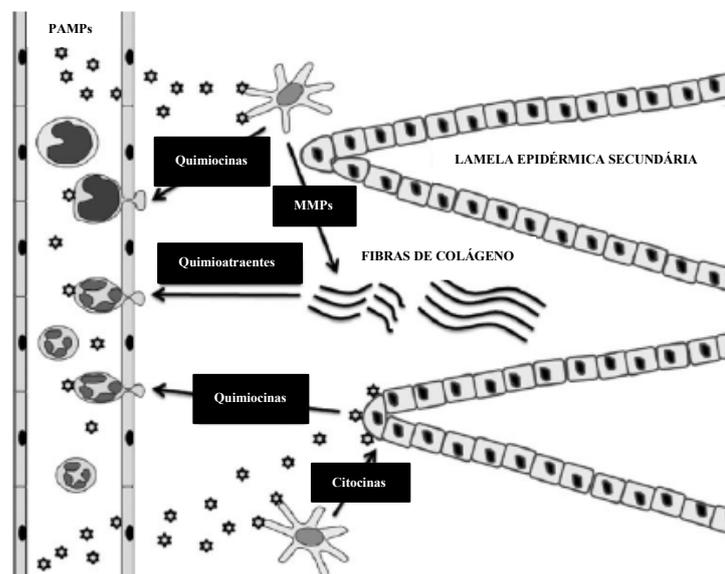
A cascata inflamatória é variável de acordo com a virulência do patógeno, com o tipo de receptor acionado, com o grau de dano tecidual e com a presença de coestimulação (Tizard, 2013a; Tizard, 2013b). A resposta imune precoce e agressiva, antes local, acaba ocorrendo em todo o organismo (Bone et al., 1992; Hotchkiss e Karl, 2003), acarretando danos teciduais generalizados e, conseqüentemente, disfunção e até mesmo falência de órgãos, como à falha do ASFD no cavalo (Belknap, 2009).

O desenvolvimento de disfunção de órgãos tem efeito sobre a sobrevivência de humanos com sepsé (Cecconi et al., 2018). Em equinos, a laminite parece ser a conseqüência comum de

doenças complicadas pela inflamação sistêmica e parece ser uma forma de disfunção de órgão-alvo crítica para a sobrevivência de cavalos adultos com sepse (Van Eps e Burns, 2019). No entanto, a fisiopatogenia da síndrome da disfunção múltipla de órgãos (MODS) ainda é pouco compreendida e os critérios diagnósticos não são bem definidos, assim como para SIRS/Sepse em equinos.

#### 2.4.3. Eventos inflamatórios nas lamelas dérmicas

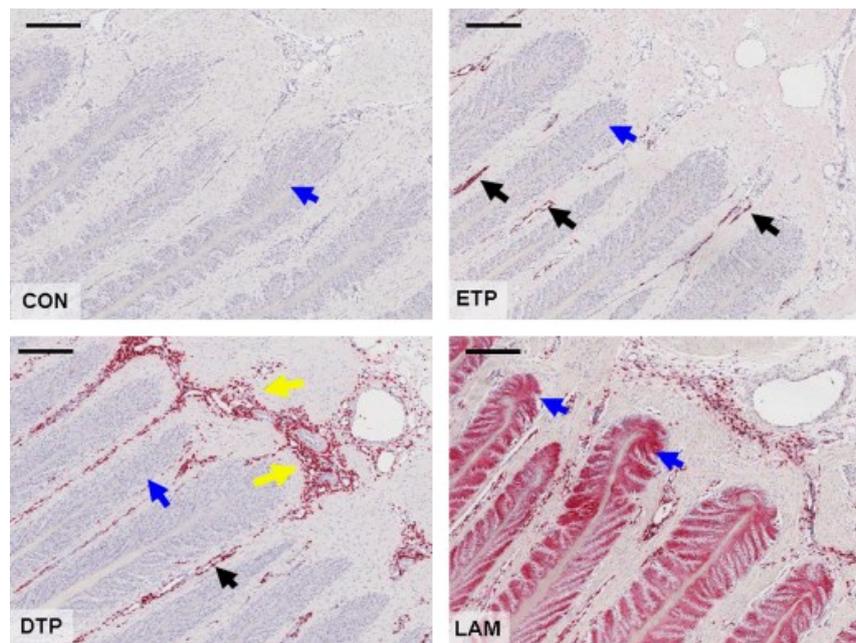
O casco é uma extensão da pele, portanto os mecanismos de barreira física e biológica se assemelham. Uma das aptidões primárias do tegumento é a propriedade de reconhecer moléculas padrões associadas a patógenos e ao dano (PAMPs e DAMPs), e recrutar células de defesa para impedir a invasão por patógenos e promover a reparação tecidual (Bos e Luiten, 2009). Portanto, a ativação de PRRs e dos receptores de moléculas inflamatórias nas células imunes residentes e queratinócitos no casco (Figura 4), resulta invariavelmente em uma resposta inflamatória lamelar (Hotchkiss e Karl, 2003; Leise, 2017).



**Figura 4:** Diagrama do provável papel do sistema imune lamelar em casos de laminite relacionada à sepse (LRS). Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), absorvidos do insulto primário, circulam no organismo e alcançam o tecido lamelar. As células residentes na derme lamelar e os queratinócitos são ativados, promovem a sinalização inflamatória e, conseqüente, rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio. Macrófagos residentes, também podem secretar metaloproteinases (MMPs), que degradam a matriz extracelular. Adaptado de Faleiros e Belknap (2017).

Na SIRS/sepse, a migração de leucócitos para os tecidos é um fator inicial importante na lesão inflamatória que promove disfunção e falha de órgãos (Black et al., 2006). Com o

desenvolvimento e avanço de técnicas de biologia molecular, foi demonstrado nos modelos de indução à laminite que a inflamação é componente do processo fisiopatológico da LRS. Mediadores inflamatórios e influxo de leucócitos foram identificados nos estágios iniciais de desenvolvimento, antes mesmo da apresentação clínica da laminite (Belknap et al., 2007; Black et al., 2006; Fontaine et al., 2001; Faleiros et al., 2009; Noschka et al., 2009; Faleiros et al., 2011). Imunohistoquímica utilizando anticorpo contra calprotectina (CP), uma proteína específica de neutrófilos e monócitos/macrófagos ativados, que também pode ser expressa por células epidérmicas inflamadas e/ou sob estresse, raramente foi detectada nas lamelas de cavalos saudáveis (Faleiros et al., 2009; Visser e Pollitt, 2011; Laskoski et al., 2010). Marcações de leucócitos CP+ aumentaram na região lamelar em 1,5 h (53 vezes), no início da fase de desenvolvimento (151 vezes), e no início da claudicação (106 vezes) de laminite induzida por BWE (Figura 5, Faleiros et al., 2009). A migração dos leucócitos através da matriz extracelular das lamelas dérmicas em direção a MB das lamelas epidérmicas foi observada no início da fase de desenvolvimento, o que parece iniciar a desestruturação e o dano tecidual, que culminam na falha do ASFD. A marcação de CP+ nas CEBL (Faleiros et al., 2009) e a expressão de PPRs e de genes inflamatórios foram identificados no início da claudicação (Grau Obel 1) (Leise et al., 2015) e sustentam que o dano a junção dermo-epidérmica é em consequência da emigração e degranulação de leucócitos, mas também exprime um papel crítico das CEBL nos eventos que levam à falha estrutural das lamelas na SRL (Leise, 2017).



**Figura 5:** Fotomicrografias de tecido laminar de cavalos com laminite induzida por extrato de noqueira preta (BWE), mostrando a imunolocalização da calprotectina (vermelho) nos grupos: controle (CON), 1,5 horas após BWE (ETP), no início da fase de desenvolvimento (DTP, 3-4 horas após BWE) e no

início da claudicação (LAM, 10–12 horas após o BWE). Observa-se um número crescente de leucócitos perivasculares no tecido laminar (começando em ETP, setas pretas), e ao redor dos vasos da derme profunda em momentos posteriores (começando em DTP, setas amarelas). A expressão epidérmica intensa de calprotectina é observada no LAM (setas azuis) em comparação com a coloração insignificante no CON ou mesmo ETP e DTP (setas azuis), indicando que a migração leucocitária induziu inflamação na epiderme. Barras de escala com 240  $\mu\text{m}$ . Adaptado de Faleiros et al., 2009.

## **2.5. Apresentação clínica da laminite relacionada à sepse**

A laminite associada a quadros sépticos, como a duodenojejunité proximal, enterocolite, cólicas estrangulativas, broncopneumonia e metrite, pode ocorrer em dias após o início da doença primária. Um aumento da frequência cardíaca comumente é observado, mesmo com a resolução do quadro inicial. A elevação da temperatura da muralha dos cascos e o pulso latejante da artéria digital palmar podem preceder ou ocorrer concomitantemente com a claudicação. A incidência nos membros torácicos é habitual, mas os quatro membros podem ser acometidos. O início da claudicação na LRS ocorre frequentemente de forma aguda e óbvia (Hunt, 1993).

A classificação da laminite pelo sistema de Obel é normalmente usado para definir a gravidade da claudicação. A classificação de Obel (1948) varia do: grau 1, em que o cavalo alterna e eleva incessantemente os membros; grau 2, no qual o cavalo se move voluntariamente, mas com evidente dificuldade de apoio em piso duro e um membro pode ser elevado sem dificuldade; grau 3, em que o cavalo reluta em caminhar quando estimulado e resiste a tentativas de levantar um dos membros; ao grau 4, no qual o cavalo recusa a se mover e levantar um dos membros quando solicitado.

## **2.6. Terapias e prevenção direcionadas a laminite relacionada à sepse**

Terapias específicas bem-sucedidas para laminite permanecem indefinidas. A prevenção e tratamento da laminite relacionada à sepse (LRS) se baseia na terapêutica da causa primária, no controle da resposta inflamatória sistêmica, no suporte hidroeletrólítico e no estabelecimento precoce da crioterapia nos dígitos. Contudo, inúmeros fatores, como peso, raça, idade, intensidade do insulto primário, distúrbios endocrinopáticos prévios, imunocompetência, entre outros, influenciam na susceptibilidade e no grau de lesão lamelar. Por isso a terapêutica da laminite pode ser tão desafiadora (Van Eps e Burns, 2019).

A maioria das terapias são direcionadas à prevenção dos casos de alto risco de laminite, assim, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são os fármacos mais comumente utilizados, variáveis com o curso da doença. Na laminite em curso com inflamação sistêmica/sepsis, o flunixin meglumine (1 mg/kg IV SID) foi a medicação de preferência devido à alta eficácia no controle da toxemia e mediação inflamatória (Moore et al., 1986; Semrad et al., 1987; Jackman et al., 1994). No entanto, recentemente, verificou-se que em processos sépticos associados a distúrbios gastrointestinais a utilização de flunixin pode não ser interessante. Estudos revelaram que a inibição da COX-1 atrasa mecanismos de reparo no intestino lesionado e diminui a recuperação da mucosa jejunal com lesão isquêmica. Alterações não encontradas na utilização de firocoxib (altamente COX-2 seletivo) (Campbell e Blikslager, 2000; Cook et al., 2009). Adicionalmente, também foi observada redução da motilidade intestinal após a administração de inibidores inespecíficos da COX (Van Hoogmoed et al., 2000).

Segundo Laskoski et al. (2016), o estresse oxidativo pode desempenhar papel fundamental na LRS por alterações gastrointestinais. Neste estudo, biomarcadores de estresse oxidativo foram imunomarcados nas lamelas do casco de equinos que vieram à óbito por distúrbios gastrointestinais. Portanto, em casos de processos inflamatórios sistêmicos com risco potencial de desenvolvimento de laminite, o uso de dimetilsulfóxido (DMSO 20-50mg/kg SID) é sustentado (Sullins et al., 2004; Dabareiner et al., 2005) devido a capacidade de eliminar radicais livres de oxigênio quando administrado antes, durante e várias horas após o insulto (Ali, 2001) e sem apresentar complicações.

Por outro lado, em casos de laminite aguda a administração de fenilbutazona (2,2–4,4 mg/kg IV SID) é desejável e indicada, pois fornece analgesia adequada e controla o possível desenvolvimento da dor neuropática (Driessen et al., 2010). Contudo, o uso de flunixin e fenilbutazona, fármacos ciclooxigenase (COX) não seletivos, é limitado devido os efeitos deletérios gastrointestinais. Neste contexto, o uso de inibidores mais seletivos COX-2 é indicado para o tratamento da laminite por longo prazo (Yamaga et al., 2012; Cox et al., 2013; Noble et al., 2012). Por conseguinte, o meloxicam (0,6 mg/kg IV SID) e o firocoxib (0,1 mg/kg PO SID) fornecem segurança e alívio da dor aceitável na laminite e são preferivelmente empregados em tratamentos longevos (Divers, 2017).

A crioterapia terapêutica digital é, comprovadamente, a única terapia consistente capaz de prevenir a laminite. Uma redução de dez vezes na incidência de laminite clínica foi vista em cavalos com colite submetidos a crioterapia (Kullmann et al., 2013). Quando empregada em casos potenciais ou na fase de desenvolvimento da laminite, a crioterapia digital foi capaz de reduzir a inflamação e a intensidade da lesão lamelar na LRS (Van Eps et al., 2012; Van Eps et al., 2014). O dígito foi resfriado à temperaturas entre 3 e 8 °C por 48-72 horas, em modelos experimentais (Van Eps e Pollitt, 2004; Van Eps e Pollitt, 2009a), mas a duração do tratamento é variável. De modo preferencial, é prudente prolongar a crioterapia por 24-48 horas após a resolução do quadro inflamatório sistêmico sem haver complicações deletérias (Van Eps e Pollitt, 2017).

O grupo EQUINOVA estudou na última década diversas terapias para minimizar o risco potencial da LRS (Lima, 2012; Júnior, 2017), promover suporte ao casco e conforto ao cavalo com laminite (Paz, 2018) e potencialmente regenerar o ASFD (Oliveira, 2019). O emprego de reparexina, um fármaco capaz de inibir a migração de neutrófilos em processos inflamatórios agudos, reduziu a expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 e minimizou os sinais clínicos e danos lamelares de cavalos induzidos à laminite por OF (Lima et al., 2013). Em outra estratégia, a leucoaférese terapêutica foi capaz de reduzir da contagem sanguínea de células inflamatórias, os sinais de sepsis, o infiltrado leucocitário no casco, retardar a evolução da lesão lamelar e prevenir a mortalidade de cavalos submetidos ao modelo de sobrecarga com OF (Júnior, 2017). Nesta linha de pesquisa o grupo EQUINOVA pretende avaliar os efeitos anti-inflamatórios, sistêmicos e lamelares da alga marinha *Lithothamnium spp.*

### **2.7. *Lithothamnium spp.***

O *Lithothamnium* é uma alga marinha vermelha, que se caracteriza pelo acúmulo de minerais da água do mar nas folhas durante seu crescimento. O extrato é obtido a partir das folhas que se soltam e se depositam no fundo do oceano. As folhas são então separadas de materiais estranhos, esterilizadas, secas e moídas, sob certificação (Aslam et al., 2010). O *Lithothamnium spp.* contém elevados teores de minerais, em especial o cálcio e o carbonato de magnésio, que se encontram na forma de cristais de calcite nas membranas celulares da alga. Além disso são fontes de polissacarídeos sulfatados, um componente com potencial bioativo (Faulkner, 2000; Soares et al., 2012).

### 2.7.1. Componentes e efeitos do *Lithothamnium* spp.

Polissacáridos sulfatados (PSS) de algas marinhas podem ser classificados como bioativos por possuírem ação biológicas como efeitos anticoagulante, antioxidante, antitumoral, antiviral e anti-inflamatório (Jiao et al., 2011). Além disso, existem relatos de que a própria composição mineral dessas algas também pode apresentar efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (King et al., 2005; Henrotin e Aigner, 2005; Kurz, 2002; Frested et al., 2008; Frested et al., 2009). Dessa forma, acredita-se as que propriedades anti-inflamatórias do *Lithothamnium* spp. advém tanto de elementos minerais como do PSS.

Já existem várias evidências científicas dos efeitos benéficos da suplementação por algas vermelhas. O uso de *Lithothamnium corallioides* (2,4g SID, PO) reduziu a dor e a rigidez articular de humanos com osteoartrite moderada a grave no joelho (Frested et al., 2008; Frested et al., 2009). De modo geral, essa terapia apresentou melhores efeitos quando associada aos AINEs na metade da dose, trazendo o benefício de reduzir os efeitos colaterais, manter a analgesia e melhorar significativamente a amplitude de movimento articular e a distância percorrida (Frested et al., 2009). Ademais, o *L. muelleri* (100mg/kg BID, PO) preveniu a inflamação e hipernocicepção em camundongos com artrite (Costa et al., 2015). O *Lithothamnium* spp. apresentou efeitos protetores na reabsorção óssea induzida pelo movimento ortodôntico e doença periodontal em ratos, ao reduzir a função osteoclástica e a inflamação local (Taddei et al., 2014). Efeitos similares têm sido demonstrados pelo fornecimento de minerais como manganês, selênio, magnésio, cobalto e zinco em humanos e animais (Shakibaei et al., 1996; Sasaki et al., 1994; Gaby, 1999; King et al., 2005; Henrotin e Aigner, 2005; Kurz, 2002), apesar do mecanismo de ação ainda não ser claro.

Efeitos anti-inflamatórios do *Lithothamnium* spp. foram demonstrados também em outros órgãos. O fornecimento de *Lithothamnium calcareum* suprimiu a formação de pólipos no cólon de camundongos saudáveis (Adey e McKibbin, 1970) e foi capaz de reduzir pólipos associados à inflamação gastrointestinal em ratos expostos à dieta rica em gordura (Aslam et al., 2010). Efeito anti-inflamatório dose dependente do *Lithothamnium corallioides* foi demonstrado *in vitro* no córtex cerebral de ratos, por meio da redução na produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por células da glia estimuladas por LPS (Ryan et al., 2011).

Adicionalmente, o uso de *L. muelleri* demonstrou propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras ao prevenir o desenvolvimento da doença clínica e a mortalidade associada a doença do enxerto contra o hospedeiro em ratos transplantados com células halogênicas. Uma redução significativa de lesões hepáticas e intestinais, de translocação bacteriana e da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no intestino e fígado de ratos imunocomprometidos com a doença foi observada com o uso de *L. muelleri* (Rezende et al., 2013).

As propriedades específicas das frações ricas em polissacarídeos do *Lithothamnium* spp. foram estudadas. *In vitro*, o polissacarídeo sulfatado de microalgas vermelhas foi capaz de inibir o deslocamento de polimorfonucleares em direção à molécula quimioatraente padrão e bloquear parcialmente a adesão à células endoteliais (Matsui et al., 2003). Soares et al. (2012) demonstraram que frações de polissacarídeo do *Lithothamnium muelleri* (10mg/kg IV) foram capazes de inibir significativamente o rolamento de leucócitos, *in vivo*, induzido por LPS. É sugerido que o mecanismo de ação do *Lithothamnium* spp. é em parte, devido a inibição do recrutamento de células imunes em direção a estímulos inflamatórios.

De modo geral, a teoria mais aceita sobre os efeitos biológicos das algas marinhas vermelhas é a imunomodulação induzida pelos polissacarídeos sulfatados (Soares et al., 2012; Matsui et al., 2003; Rezende et al., 2013; Chaves et al., 2013; Costa et al., 2015). As propriedades terapêuticas são variáveis com os monossacarídeos constituintes e as ligações existentes nos oligo e polissacarídeos (Courtois, 2009), e que a investigação deve ser mais aprofundada.

#### 2.7.2. Toxicidade do *Lithothamnium* spp.

Ensaio de toxicidade aguda e subcrônica foram realizados em ratos com *Lithothamnium calcareum* na dose de 2000 mg/kg dose única e 1000 e 2000 mg/kg BID por 90 dias, sem se observar alterações macro ou microscópica nos animais. No ensaio de toxicidade subcrônica, aumentos nas concentrações sanguíneas de creatinina, proteína total, albumina e cálcio foram evidenciados. Os autores desse estudo alegaram que o uso contínuo deve ser realizado com cautela e que avaliações toxicológicas e mais estudos são necessários para o uso com segurança (Almeida et al., 2012). No mesmo estudo, os ensaios de gastroproteção verificaram que a dose de 480 mg/kg foi capaz de reduzir as lesões gástricas e aumentar o pH gástrico, ao passo que,

as doses mais baixas (30 e 120 mg/kg) não induziram efeito protetor, mas não intensificaram lesões na mucosa gástrica, como o observado no uso de AINEs.

### 2.7.3. Protocolos de utilização de *Lithothamnium* spp.

As recomendações de seu uso na forma de suplemento têm sido feitas ainda com pouca base científica. Em humanos com osteoartrite (OA) moderada a grave do joelho, o tratamento com *L. corallioides* foi realizado na dose de 2400mg SID PO durante 12 semanas (Frested et al., 2008; Frested et al., 2009). Já em ratos com OA induzida, o tratamento de OA foi realizado com *L. muelleri* na dose de 100 mg/kg BID PO durante 10 dias antes do desafio (Costa et al., 2015). Em ratos transplantados, o *L. muelleri* foi administrado em concentrações de 1% da dieta, iniciando no primeiro dia antes do transplante de esplenócitos em ratos, até o término experimental com 20 dias (Rezende et al., 2013).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais e delineamento experimental

A metodologia experimental foi aprovada pelo Comitê de Ética Sobre Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais CETEA/UFMG protocolo nº 281/2013. Foram utilizados doze equinos hípidos, sem raça definida, fêmeas, com idade, peso e escore de condição corporal médio de  $10,5 \pm 5$  anos,  $430 \pm 41$  kg,  $5 \pm 1$  (escala de 1 a 9), respectivamente. As éguas apresentavam exames físicos normais, sem histórico prévio de claudicação relacionada aos cascos e em anestro. As éguas foram separadas individualmente, devidamente identificadas e instaladas em baias individuais do Hospital Veterinário da UFMG entre os meses de junho e julho de 2015. Os animais foram previamente adaptados ao confinamento durante 1 semana, recebendo dieta exclusiva à base de feno de gramínea (*Cynodum* sp.) e água *ad libitum*.

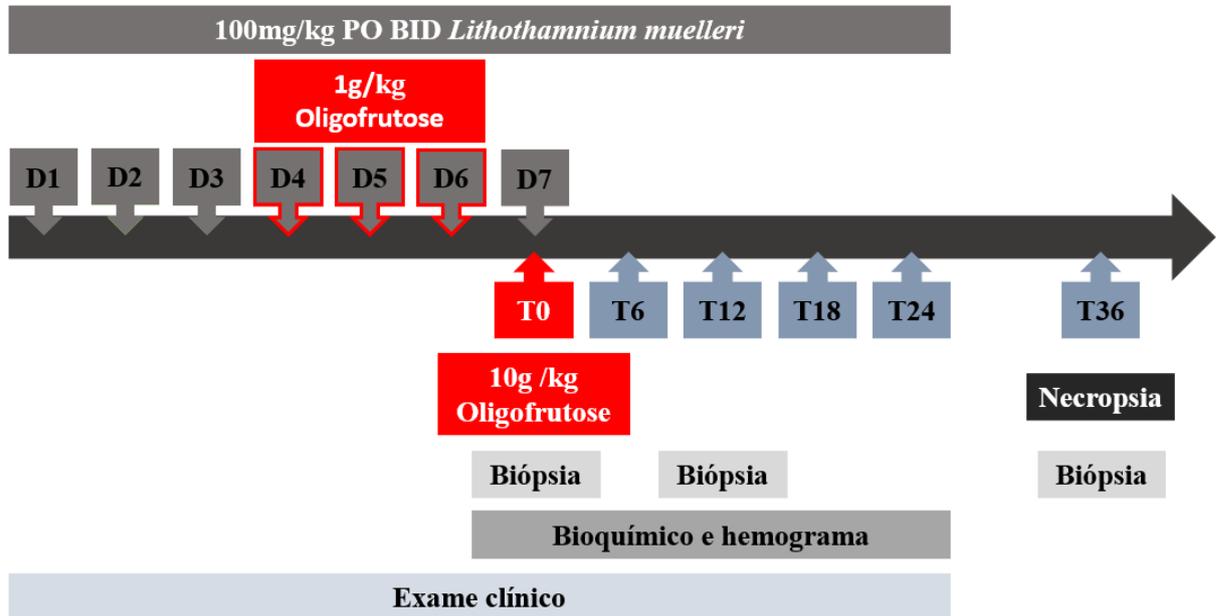
A experimentação foi delineada em blocos ao acaso. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupo controle (n=6) e grupo tratado (n=6). O cálculo de tamanho amostral foi baseado em 95% de poder estatístico, significância estatística de 5%, tamanho da diferença entre as médias dos grupos de 60%, com desvio padrão de 22% em torno da média.

#### Protocolo de administração do *Lithothamnium muelleri*

Utilizou-se o extrato de algas marinhas de *L. muelleri* comercializados por Phosther Algamar LTDA (Brasil) como um suplemento dietético (Vitalidade 50+). O produto é registrado e aprovado pela Agência de Vigilância Nacional de Saúde (número 25.003,040502 / 97 6.2119.0001.001-1). O material bruto (neste estudo denominado como *L. muelleri*) foi doado na forma de um granulado de concentrado de mineral marinho de coloração esbranquiçada. De acordo com a empresa, a alga foi lavada, sequencialmente, com água da torneira e destilada para remover o sal e todas as sujidades visíveis. Em sequência, foi moída e seca em forno ventilado.

As éguas do grupo tratado receberam 50 gramas (100 mg/kg) de concentrado mineral marinho (CMM – Phosther Algamar LTDA), em bisnagas via oral, duas vezes ao dia. O *Lithothamnium muelleri* foi administrado preventivamente durante sete dias antes da indução da laminite: três dias antes de iniciar a sensibilização, nos 3 dias seguintes de período de sensibilização e no dia

de indução de laminite. A administração se manteve na dose e via até 24 horas após a indução, como representado na figura 6.



**Figura 6:** Fluxograma do fornecimento de *Lithothamnium muelleri*, protocolo de indução de laminite, exame clínico, hemograma, bioquímico, biópsia e necropsia de equinos sobrecarregados com carboidratos.

### 3.2. Protocolo de indução da laminite

A indução de laminite foi realizada de forma semelhante em todos os animais, consistindo no período de sensibilização e indução. A sensibilização foi realizada durante três dias com a administração única diária, via sonda nasogástrica, de 1g/kg de oligofrutose (Raftilose P95 – Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda) diluída em 3 litros de água. No quarto dia, foi realizada a indução com 10g/kg de oligofrutose diluída e administrada no mesmo volume de água e via de administração (Figura6). O protocolo de indução de laminite foi baseado em relatos prévios (French e Pollitt, 2004; Van Eps e Pollitt, 2006).

Entre 30 e 36 horas após a indução de laminite com sobrecarga de oligofrutose os equinos foram eutanasiados, a fim de impedir o sofrimento devido ao severo quadro séptico que apresentaram.

### 3.3. 3.3. Exame físico geral

Os animais foram avaliados diariamente no período de adaptação, no período de sensibilização e nos tempos 0, 6, 12, 18, 24 horas pós-indução (Figura 6), por um único avaliador experiente, a fim de evitar variações individuais.

As frequências cardíaca e respiratória e a motilidade intestinal foram avaliadas por auscultação, durante 1 minuto. A frequência cardíaca foi aferida na área cardíaca esquerda. Alterações no som cardíaco foram registradas quando presentes. A frequência respiratória foi obtida por ausculta do terço médio da traqueia. Alterações no ruído traqueal e no padrão respiratório foram registradas quando presentes. A progressão, a frequência e a amplitude dos borborismos intestinais foram avaliadas nos quadrantes dorsal e ventral, direito e esquerdo. Os borborismos intestinais em cada quadrante foram classificados individualmente em ausência de motilidade (0), hipomotilidade intensa (1), hipomotilidade (2), normomotilidade (3) e hiperomotilidade (4).

As mucosas oral e oculares foram avaliadas e classificadas como hipocorada (0), normocorada/ósea (1), hiperacorada/hiperêmica (2), congesta (3), cianótica e com presença de halo toxêmico (4). O tempo de preenchimento capilar foi determinado após pressionar a mucosa gengival. As artérias digitais palmares e plantares foram avaliadas por palpação para identificar a presença e intensidade do pulso digital. A temperatura retal foi aferida utilizando termômetro digital. Alterações no padrão das fezes foram registradas quando presentes. Para análise, a consistência das fezes foi classificada como 0: ausência de alterações; 1: pastosas; 2: fluidas; 3: diarreia profusa.

A sensibilidade do casco dos membros torácicos foi testada utilizando pinça de casco para pinçamento da muralha e sola com aumento de pressão constante e gradual. A sensibilidade de casco foi classificada como presente ou ausente. A claudicação foi avaliada de acordo com o grau de AAEP, que varia de 0 a 5 (Tabela 2) e o grau de claudicação por laminite avaliado segundo Obel (1948) e varia de 1 a 4 (Tabela 3), observando os animais caminhando e ao trote em piso de concreto plano, em linha reta e nas curvas (Lima et al., 2013).

**Tabela 2:** Grau AAEP de claudicação em equinos.

Grau	Sinais clínicos
0	Ausência de claudicação perceptível em quaisquer circunstâncias (suportando peso, em círculo, em superfície inclinada, em superfície dura).
1	Claudicação difícil de observar ou inconsistente, independente das circunstâncias.
2	Claudicação difícil de observar ao passo e trote em linha reta, mas sempre aparente e consistente sob certas circunstâncias.
3	Claudicação sempre observável ao trote em todas as circunstâncias.
4	Claudicação óbvia ao passo, com marcadas alterações de altura de cabeça e/ou garupa e no arco da passada.
5	Claudicação intensa que reduz o apoio de peso em movimento ou mesmo em repouso ou representa a incapacidade de se mover.

**Tabela 3:** Grau Obel de laminite em equinos (Obel, 1948).

Grau	Sinais clínicos
1	O cavalo troca apoio dos membros torácicos de forma constante, em frequência acima do esperado.
2	O cavalo move-se ao passo voluntariamente ou quando solicitado, mas com evidente dificuldade de apoio em piso duro. Um membro pode ser levantado sem dificuldade.
3	O cavalo apresenta relutância em caminhar quando estimulado e resiste vigorosamente às tentativas de se levantar um dos membros.
4	O cavalo se recusa vigorosamente em movimentar quando estimulado ou conduzido ao cabresto e a levantar qualquer um dos membros quando solicitado.

### 3.4. Hematologia e Bioquímico Clínico

A avaliação hematológica e da concentração de proteínas e enzimas sanguíneas foi realizada no período de fornecimento de *Lithothamnium*, de sensibilização e nos tempos 6, 12, 18, 24 horas pós-indução (Figura6). A coleta de material biológico ocorreu imediatamente após aferição dos parâmetros clínicos. A venopunção da jugular foi realizada em todos os momentos com o uso de um sistema de coleta a vácuo (vacutainer) e o sangue acondicionado em frascos sem anticoagulante ou com ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA). As amostras foram homogeneizadas 20 vezes lentamente e permaneceram 3 minutos em descanso em temperatura ambiente, sempre protegidos da luz. Imediatamente após, as amostras com EDTA foram

homogeneizadas lentamente por 5 minutos à 14 RPM (PHOENIX®) e as amostras sem anticoagulante centrifugadas por 6 min à 3400 RPM (COMBATE - CELM®).

Para determinação do volume globular (VG) e da concentração de fibrinogênio (FIB) foi realizada a centrifugação de dois tubos de micro hematócrito durante 5 min a 3500 RPM. Após a leitura do volume globular por meio de escala de referência (CELM®), a concentração de proteína plasmática total (PT) foi determinada por refratômetro. O FIB foi determinado por métodos de coagulação. O segundo tubo de micro hematócrito foi mantido em banho-maria à 56°C por 3 minutos e novamente centrifugado. A PT foi novamente aferida por refratômetro. A diferença obtida entre a PT pré e pós-processamento indicou o FIB.

A contagem das células sanguíneas e plaquetas foi realizada em aparelho automático através da técnica de impedância elétrica (ABACUS JUNIOR VET - DIATRON®). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com panóptico de hematoxilina-eosina, avaliando 100 leucócitos. Alterações celulares quando encontradas foram registradas. A presença de neutrófilos tóxicos foi classificada como, 0: ausência de neutrófilos tóxicos; 1: presença considerável de neutrófilos tóxicos; 2: intensa presença de neutrófilos tóxicos; 3: quase a totalidade dos neutrófilos com toxicidade.

Os ensaios bioquímicos foram realizados pelo sistema de identificação por espectrofotometria em analisador automatizado (COBAS MIRAGE-ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEM®). Utilizou-se kits comerciais específicos (Kovalent®) para determinar as concentrações séricas de glicose (GLI), ureia (URE), creatinina (CRE), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltranspeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), proteína sérica total (PST), albumina (ALB), bilirrubina total (BT) e bilirrubina direta (BD). Os níveis séricos de globulina (GLO) e bilirrubina indireta (BI) foram determinados pela diferença entre as concentrações séricas de PST e ALB e pela diferença entre BT e BD, respectivamente. Em todos os momentos os tubos de amostra sem anticoagulante e eppendorfs foram mantidos protegidos da luz para não promover alterações na bilirrubina fotossensível. Amostras de soro foram acondicionadas em nitrogênio líquido por 1 semana e então devidamente transferidas e mantidas em freezer a -80°C.

### 3.5. Determinação de SIRS/Sepse

A ocorrência de SIRS/Sepse foi determinada pela presença de dois ou mais parâmetros alterados, com base na tabela 4, nos equinos com sinais indicativos de lesão ou infecção, como exemplo a diarreia. Os equinos foram classificados com SIRS ou sepsis ao apresentarem dois ou mais parâmetros alterados na ausência ou suspeita de infecção, respectivamente (Barton e Peroni, 2018).

**Tabela 4:** Critérios de diagnóstico para SIRS/sepsis em cavalos adultos (Barton e Peroni, 2018).

Parâmetro	Critério
Temperatura retal	> 38,5 ° C ou <37 ° C
Frequência cardíaca	> 52 batimentos / min
Respiratório	> 20 respirações/min ou PaCO <sub>2</sub> <32 mm Hg
Contagem de glóbulos brancos	> 12.500 células / µL ou <5000 células / µL ou > 10% de neutrófilos imaturos

PaCO<sub>2</sub>: pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial.

SIRS: dois ou mais parâmetros alterados na ausência de infecção.

Sepsis: dois ou mais parâmetros alterados na presença de infecção.

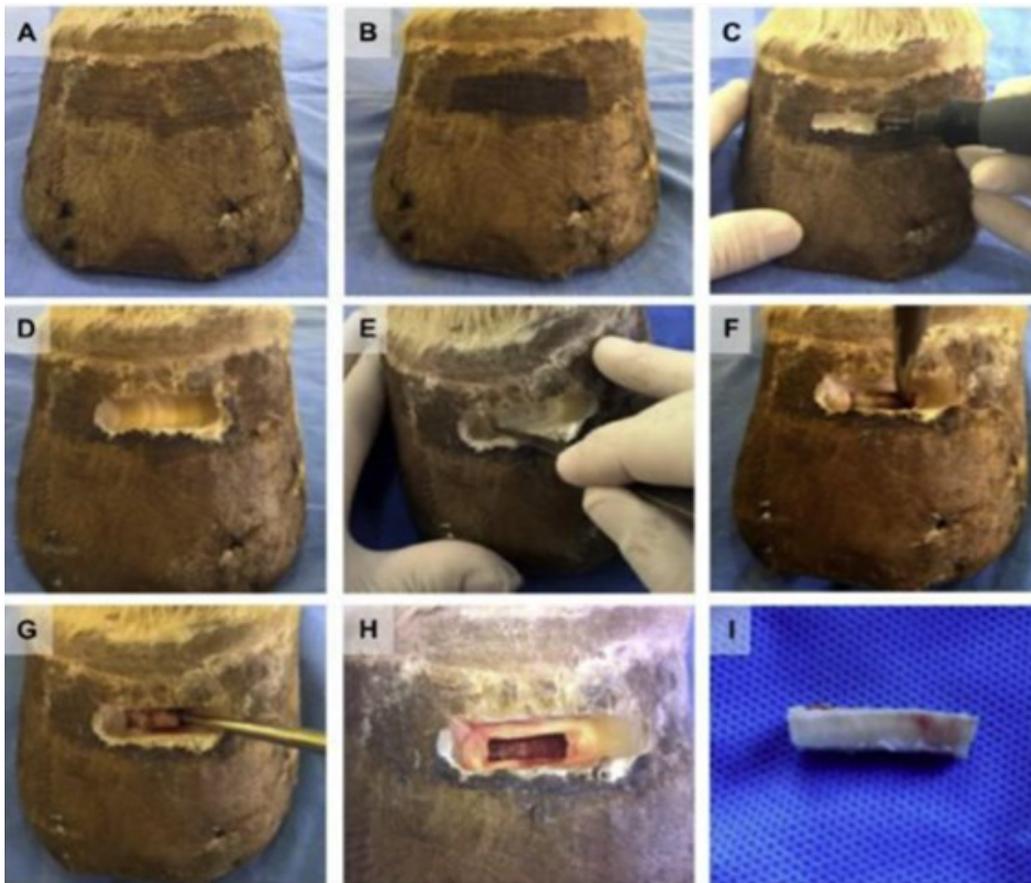
### 3.6. Biópsia de casco

As biópsias do estrato lamelar do casco dos equinos foram realizadas, de acordo com descrição prévia (Júnior, 2017) no T0 basal e nos tempos T12, T36 horas pós-indução de laminite (Figura 7). As amostras foram coletadas individualmente de cada casco nos determinados tempos, seguindo a sequência de membro pélvico esquerdo (T0 - controle), pélvico direito (T12) e membros torácicos (T36). Para a realização do procedimento, os animais foram sedados com detomidina 0,1 µg/kg pv IV (Dormium – Agener União®) e os cascos dessensibilizados por anestesia perineural do nervo digital palmar/plantar lateral e medial com 5 ml de lidocaína 2% (Xylestesin 2% - Cristália®), abaxial aos ossos sesamóides proximais.

Em seguida, foi realizada a antissepsia da muralha do casco e a marcação na face dorsal da muralha um ponto 3 cm distal à borda coronária. O tecido córneo de uma área com aproximadamente 4x1cm, sobre o ponto 3 cm distal à borda coronária, foi desbastado com escafificador autoclavado chato de 9,5 mm de diâmetro acoplado a uma microretífica (Dremel Série 300®). O estrato externo e médio da muralha foi totalmente desbastado. Um garrote foi então aplicado na altura do boleto para reduzir a hemorragia. O delgado tecido córneo restante,

o estrato lamelar e a derme profunda foram incisadas para demarcação da área de biópsia com bisturi lâmina 22 (Figura7).

Para retirar o fragmento foi utilizado o instrumento cirúrgico, denominado lamelótomo de Falcão-Faleiros (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual INP-BR102013018765-8). O lamelótomo foi posicionado perpendicularmente ao casco na borda lateral da incisão e pressionado no sentido axial até a derme profunda. Em seguida, avançou-se o lamelótomo paralelamente à falange distal até atingir o limite medial da área desbastada para extração da amostra tecidual. Um fragmento correspondente a metade da amostra foi imediatamente imergido em formalina 10%, para análise histopatológica (Figura7).



**Figura 7:** Sequência fotográfica de procedimentos de biópsia lamelar com o lamelótomo de Falcão-Faleiros mostrando a demarcação do local da biópsia (A-B), o desbaste do tecido queratinizado com um cortador plano ligado a uma ferramenta elétrica rotativa (C-D), a incisão das margens internas com um bisturi (E), a inserção (F-G) e o avanço do lamelótomo. Aspecto da ferida cirúrgica (H) e da amostra (I) (Júnior, 2017).

A ferida cirúrgica foi inspecionada e a área obliterada com gaze estéril, e o defeito na muralha fechado com material de impressão odontológica (Perfil®) e o casco protegido com atadura

crepom e fita adesiva tipo silver tape, impermeabilizando. Logo após a realização do curativo o garrote foi retirado. Nos quatro dias seguintes ao procedimento, houve presença de tecido de granulação cobrindo a superfície da falange distal. A limpeza da ferida cirúrgica e novo curativo foram realizados a cada 48 horas, utilizando-se soro fisiológico e solução de clorexidina a 0,2% quando necessário.

### **3.7. Processamento da amostra tecidual lamelar**

As amostras obtidas foram armazenadas em formalina tamponada 10% por 48 horas e em seguida foram desidratadas em álcool 70 e processadas de forma rotineira para inclusão em parafina. Cortes histológicos com 4 µm de espessura foram alocados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de shiff (PAS) para a observação da integridade das lâminas dérmicas, epidérmicas, células e membrana basal. Cortes histológicos 4 µm de espessura foram alocados em lâminas de gelatina para marcação de calprotectina por imuno-histoquímica.

### **3.8. Imuno-histoquímica**

Para a localização precisa de neutrófilos e macrófagos ativados e expressão inflamatória nas células epidérmicas, a imunomarcação da calprotectina foi realizada segundo (Faleiros et al., 2009; Faleiros et al., 2011). Cortes histológicos aderidos em lâminas gelatinizadas sofreram desparafinação em xilol e em seguida a hidratação dos cortes em gradiente decrescente de álcool etílico. A recuperação antigênica foi realizada com proteinase K (20µg/mL de água destilada) durante 5 minutos. A inativação da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio a 10% durante 5 minutos em três banhos consecutivos. O bloqueio de marcações inespecíficas foi realizado com solução de soro equino (15µL/mL de PBS - phosphate buffered saline) durante 15 minutos. O anticorpo primário (MAC387 Abcam©) na diluição 1:250 foi incubado a 37°C por 1 hora e 30 minutos. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo foi utilizado na diluição de 1:100 durante 30 minutos. A reação foi amplificada com o sistema ABC durante 30 minutos e a marcação realizada com diaminobenzidina (DAB) por 2 minutos.

### **3.10. Morfologia e escore de lesão lamelar**

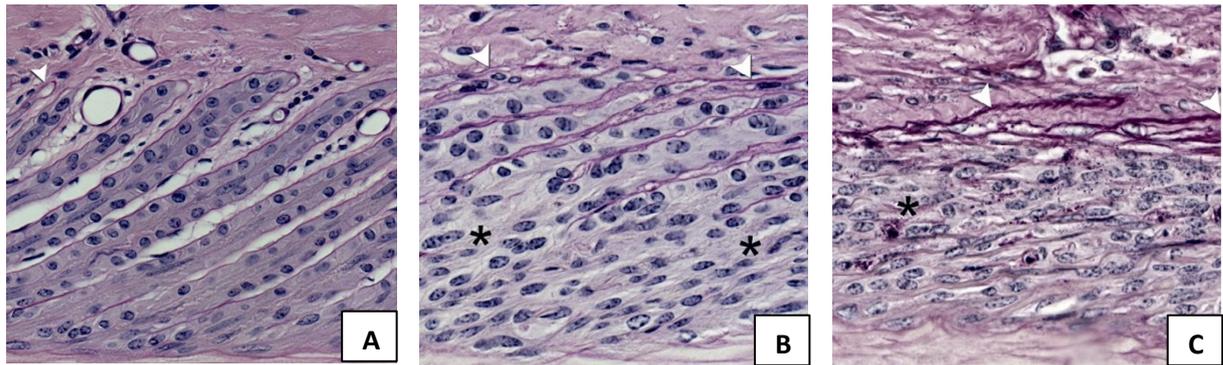
Para avaliação histológica foi utilizado o software Panoramic Viewer 2.0 for Windows (3D Histech kft., Budapeste, Hungria) que permite trabalhar com as imagens de lâminas

visualizadas pelo microscópio digital (3D Histech®) localizado no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

As lesões na junção lamelar foram classificadas de acordo com o padrão histológico descrito por Faleiros et al. (2011) (Tabela 5, Figura 8). O sistema histopatológico de escores avalia as mudanças progressivas que ocorrem na morfologia laminar durante os estágios iniciais e o colapso da MB. Todas as amostras foram avaliadas às cegas e uma nota de 0 (normal) a 6 (descolamento avançado da MB dos queratinócitos basais) determinada com base nas alterações nos queratinócitos e sinais de lesão e descolamento da MB.

**Tabela 5:** Escores de lesões microscópicas em amostras de tecido lamelar de equinos, coradas com PAS (Faleiros et al., 2011).

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



**Figura 8:** Fotomicrografia das lamelas epidérmicas secundárias (LES) com lesões promovidas por laminite induzida por oligofrutose, corte transversal da junção lamelar dorsal. A membrana basal (MB) é destacada pelo ácido periódico de Schiff (PAS) (setas brancas). **A:** Histopatologia de lesões lamelares de grau 4 (Grau Pollitt 1). As LES estão alongadas e finas e ápice em forma de taco. Os núcleos das células basais estão arredondados e anormalmente posicionados próximos a MB. Bolhas em forma de teta se formam na MB no ápice da LES (pontas de seta). A BM lamelar ainda está presente nas pontas das LDS. O diâmetro aumentado dos capilares sugere vasodilatação. **B:** Histopatologia de lesões lamelares de grau 5 (Grau Pollitt 2). A MB encontrava-se mais solta e destacada e forma filamentos de duas camadas (pontas de seta). A MB não está mais presente na ponta das LDS, entre as bases das LES. As células basais epidérmicas, sem a influência de uma membrana basal intacta e funcional, começam a se fundir em uma massa não estruturada com função suspensora comprometida (asteriscos). **C:** Histopatologia de lesões lamelares de grau 6 (Grau Pollitt 3). Os filamentos estirados de dupla camada do BM (pontas de seta) são mais longos. Praticamente toda a MB foi retirada de cada LES e foi realocado para as bordas da LDP. As LDS são desprovidas de MB, e praticamente todas as células epidérmicas lamelares coalesceram em uma massa não estruturada e multicelular (asteriscos). Adaptado de Pollitt (2016c).

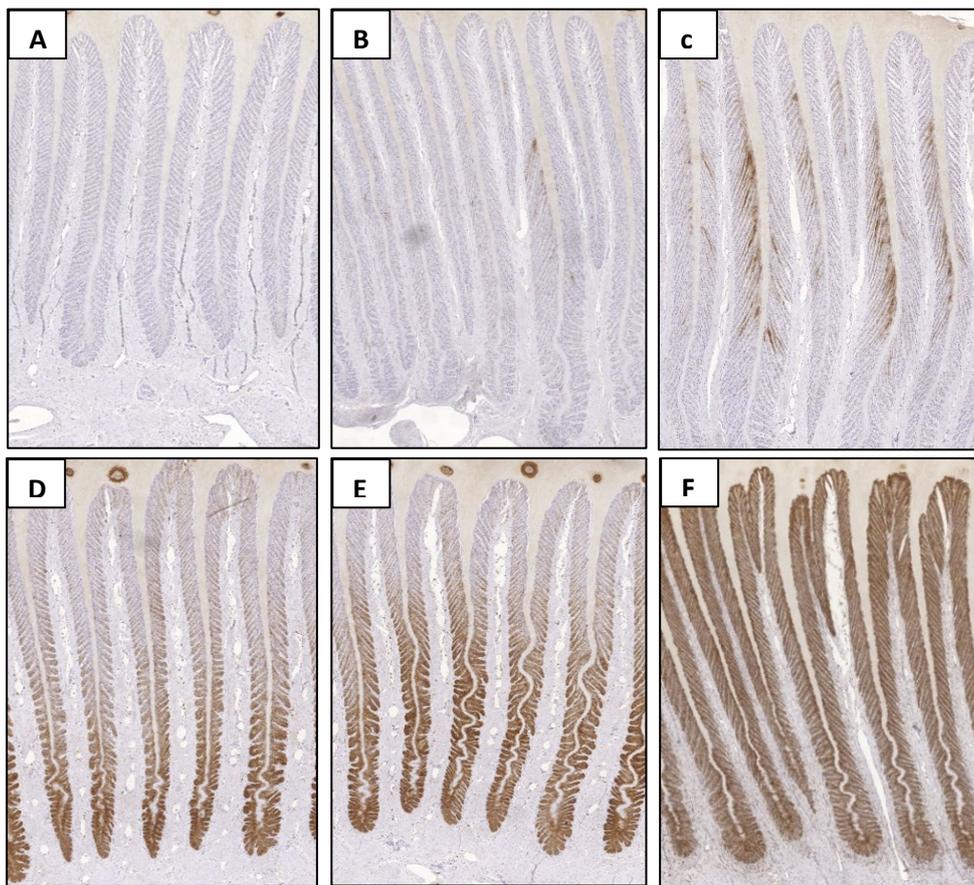
### 3.11. Imuno-histoquímica lamelar

Para avaliação imuno-histoquímica foi utilizado o microscópio digital (3D Histech®) e software Panoramic Viewer 2.0 for Windows (3D Histech kft., Budapeste, Hungria) localizados no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. A análise dos cortes de imuno-histoquímica foi realizada três vezes por um pesquisador e unicamente por dois pesquisadores, de modo cego.

Para análise da marcação de calprotectina nas lâminas epidérmicas secundárias (LES) foi utilizado aumento de 10X e 40X. Um escore de 0 a 5 de Faleiros et al. (2009) foi aplicado para cada amostra de acordo com a marcação imuno-histoquímica das lâminas epidérmicas (Tabela 6 e Figura 9).

**Tabela 6:** Escore de marcação de calprotectina por imuno-histoquímica nas lâminas epidérmicas secundárias de equinos (Faleiros et al., 2009).

Score	Marcação de calprotectina nas lâminas epidérmicas secundárias
0	Nenhum sinal.
1	Sinais localizados.
2	Presença de áreas de sinais difusos em até 25% das lâminas epidérmicas.
3	Presença de áreas de sinais difusos entre 25 e 50% das lâminas epidérmicas.
4	Presença de áreas de sinais difusos entre 50 e 75% das lâminas epidérmicas.
5	Presença de áreas de sinais difusos em mais de 75% das lâminas epidérmicas.



**Figura 9:** Fotomicrografias da imunomarcação de calprotectina nas lamelas epidérmicas secundárias (LES) em laminite induzida por oligofrutose, corte transversal da junção lamelar dorsal. A marcação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) em marrom. **A:** Escore 0, não é observado marcação de calprotectina na LES. **B:** Escore 1, marcação pontual de calprotectina na LES. **C:** Escore 2, marcação de calprotectina em até 25% das LES. **D:** Escore 3, marcação de calprotectina entre 25 e 50% das LES. **E:** Escore 4, marcação de calprotectina entre 50 e 75% das LES. **F:** Escore 6, marcação de calprotectina em mais de 75% das LES. Fotomicrografias com aumento de 4X.

Para verificar a presença e a localização de leucócitos nas lâminas dérmicas (LD) foi utilizado aumento de 40X. Um escore de 0 a 4 de Lakoski et al. (2015) foi aplicado compreendendo de ausência (0) a intensa (4) presença de leucócitos nas LD (Tabela 7, Figura 9).

**Tabela 7:** Escore de marcação de neutrófilos e macrófagos ativados nas lâminas epidérmicas secundárias de equinos (Laskoski et al., 2015).

<b>Escore</b>	<b>Intensidade de marcação de leucócitos nas lâminas dérmicas</b>
<b>0</b>	Ausência de leucócitos
<b>1</b>	Raros leucócitos nas lâminas dérmicas
<b>2</b>	Discreta presença de leucócitos nas lâminas dérmicas
<b>3</b>	Moderada presença de leucócitos nas lâminas dérmicas
<b>4</b>	Intensa presença de leucócitos nas lâminas dérmicas

A localização dos leucócitos nas lâminas dérmicas foi determinada, como descrito por Faleiros et al. (2009): (DP-I) derme profunda intravascular, (DP-P) derme profunda perivascular, (DP-ED) espaço dérmico da derme profunda, (LDP-I) lâmina dérmica primária intravascular, (LDP-P) lâmina dérmica primária perivascular, (LDS) lâmina dérmica secundária.

O número de leucócitos em  $1\text{mm}^2$  foi determinado pela contagem de células positivas para o anticorpo MAC387 (calprotectina). A média de 13 campos apresentou representatividade de 30 campos. Portanto, uma área de  $1\text{mm}^2$  foi demarcada em 13 campos distintos nas lâminas dérmicas em aumento de 40X para a contagem de células CP+. Adaptado de Júnior, 2017; Faleiros et al. 2009.

### **3.9.Estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram sujeitos ao ANOVA RM one-way para análise do grupo, seguido do teste de Tukey's para comparação dos tempos dentro de cada grupo, e, ao teste T não pareado para comparação entre os grupos em cada tempo. Nos dados não paramétricos a análise dos grupos foi realizada pelo teste de Friedman, seguido de Dunn's para comparação dos tempos e, posteriormente, submetidos ao teste de Mann-Whitney, para comparação dos grupos em cada tempo.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os equinos foram monitorados até por 36 horas após a indução. No entanto, a partir de 34 horas os cavalos vieram a óbito por choque hipovolêmico e toxêmico ou foram eutanasiados para poupá-los de sofrimento, de acordo com as normas de bem estar animal. Apenas uma égua do grupo tratado sobreviveu devido a introdução de tratamento de suporte 36 horas após à indução.

No tempo 36 horas não foi obtido dados completos de todas as variáveis que permiti-se análise estatística confiável, em consequência do agravamento rápido e variabilidade nos tempos da coleta das amostras e exame físicos. Portanto, somente os dados até 24 horas foram avaliados e discutidos.

##### 4.1. Exame físico: Trato gastrointestinal

As principais alterações encontradas no exame físico foram diarreia e hipomotilidade intestinal. O escore de motilidade intestinal e a classificação da consistência das fezes estão dispostas na tabela 8. Apesar da diferença estatística não ser detectada, todos os animais apresentaram alterações gastrointestinais em algum momento do período experimental.

**Tabela 8:** Classificação da consistência das fezes e escore de motilidade intestinal geral dos equinos submetidos a sobrecarga de oligofrutose (10g/kg) controle e tratados com *Lithothamnium muelleri* (100mg/kg PO BID, previamente durante 7 dias).

Consistência das Fezes						
Equino	Grupo	T0	T6	T12	T18	T24
A	C	N	N	Diarreicas	Diarreia Profusa	N
B	C	N	N	N	Diarreicas	Diarreicas
C	C	N	N	N	N	N
D	C	N	N	Diarreicas	N	N
E	C	N	N	N	N	N
F	C	N	N	Diarreicas	Diarreicas	Diarreicas
G	T	N	N	N	Amolecidas	N
H	T	N	N	N	Amolecidas	N
I	T	N	N	N	Amolecidas	N
J	T	N	N	N	Diarreicas	N

<b>K</b>	T	N	N	N	N	N
<b>L</b>	T	N	N	N	N	N
<b>Motilidade média*</b>						
<b>A</b>	C	3,8	2,8	2,0	2,8	2,0
<b>B</b>	C	4,0	3,3	3,3	0,5	0,0
<b>C</b>	C	2,8	3,0	2,5	1,0	0,0
<b>D</b>	C	2,3	2,3	2,0	1,0	1,0
<b>E</b>	C	3,0	3,3	3,8	1,0	3,0
<b>F</b>	C	2,5	2,3	2,0	3,0	1,8
<b>G</b>	T	3,0	2,8	3,0	3,0	2,8
<b>H</b>	T	2,5	2,8	2,5	1,0	2,0
<b>I</b>	T	2,8	2,3	3,5	2,0	2,0
<b>J</b>	T	2,0	2,3	3,0	2,8	1,0
<b>K</b>	T	2,8	3,0	3,5	1,5	1,0
<b>L</b>	T	3,0	3,3	3,0	2,5	2,8

N: Consistência normal das fezes.

\* 0: ausência de motilidade; 1: hipomotilidade intensa; 2: hipomotilidade; 3: normotilidade; 4: hipermotilidade.

A-F: Grupo controle.

G-L: Grupo tratado com *Lithothamnium muelleri*.

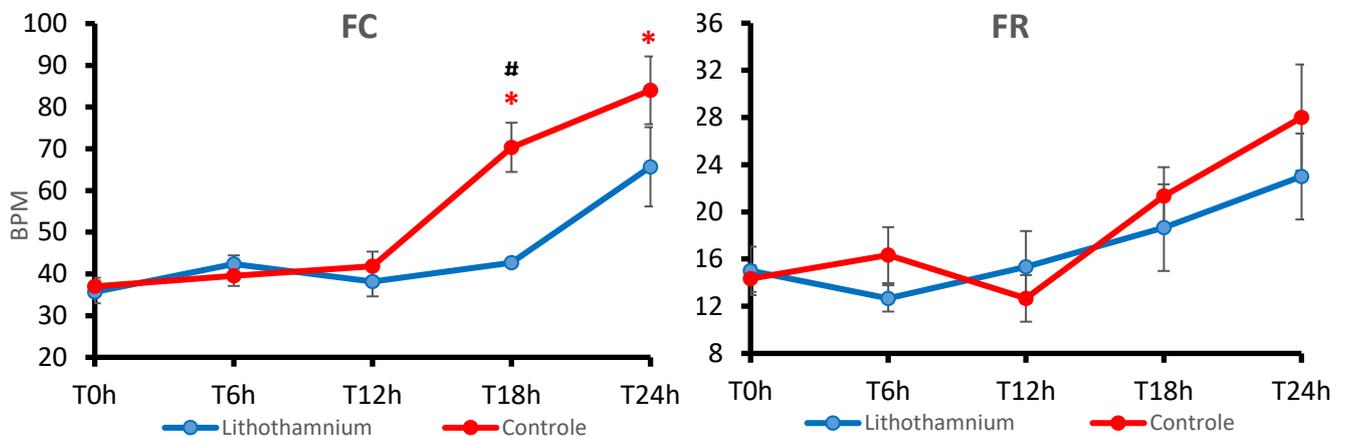
Quadros de amolecimento das fezes e diarreia profusa foram notados a partir do T12 no CON. Enquanto no LITHO, foram observados apenas no T18 e cessaram. De forma semelhante, os modelos de laminite induzida por OF (10g/kg) são caracterizados por promover diarreia profusa, que inicia em 12-16 horas e cessa em 24-44 horas (French e Pollitt, 2004; Van Eps e Pollitt, 2006). Contudo, quadros de diarreia não foram notados em todos os cavalos, como no estudo de Uberti et al. (2010) e Keller et al. (2011), provavelmente por haver diferenças individuais de microbiota e, conseqüentemente, de efeito frente a sobrecarga de carboidratos.

A hipomotilidade intensa foi observada tanto no CON quanto no LITHO a partir do T18. Contudo, apenas no CON foram identificados quadros de atonia intestinal. A motilidade intestinal apresenta boa relação com a presença de alterações e o grau de comprometimento intestinal (Barton e Peroni, 2018), portanto, tem-se indícios da ocorrência de distúrbio gastroentérico no presente estudo.

Deste modo, é importante ressaltar que as alterações gastrointestinais verificadas em ambos os grupos podem ser explicadas pela disbiose do IG em equinos submetidos à administração gástrica de OF como anteriormente descritas pelos estudos de Milinovich et al. (2006) e Milinovich et al. (2007), não havendo diferença estatística entre os grupos.

#### 4.2. Exame físico: Efeitos cardiorrespiratórios e vascular

As principais alterações encontradas foram taquicardia, taquipneia (Figura 10), congestão de mucosas e halo toxêmico, aumento do tempo de preenchimento capilar (Tabela 9).



**Figura 10:** Médias  $\pm$  erros padrão das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asteriscos indicam diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. # P=0,0009; \* P<0,0254.

**Tabela 9:** Coloração de mucosas e tempo de preenchimento capilar de equinos submetidos a sobrecarga de oligofrutose (10g/kg) controle e tratados com *Lithothamnium muelleri* (100mg/kg PO BID, previamente durante 7 dias).

Equino	Grupo	T0	T6	T12	T18	T24
A	C	N - 2"	N - 2"	N - 2"	N - 2"	N - 2"
B	C	N - 2"	N - 2"	N - 2"	Hiperêmica/Halo toxêmico - 4"	Congesta/Halo toxêmico - 4"
C	C	N - 2"	N - 2"	N - 2"	N - 2"	Hiperêmica - 2"
D	C	N - 2"	N - 2"	Hiperêmica - 2"	Hiperêmica - 4"	Congesta/Halo toxêmico - 4"

<b>E</b>	C	N - 2"				
<b>F</b>	C	N - 2"	N - 2"	N - 2"	N - 3"	N - 3"
<b>G</b>	T	N - 2"				
<b>H</b>	T	N - 2"	N - 2"	N - 2"	N - 2"	Hiperêmica - 2"
<b>I</b>	T	N - 2"	N - 2"	N - 2"	N - 2"	Congesta - 2"
<b>J</b>	T	N - 2"	N - 2"	N - 2"	N - 2"	Hiperêmica - 2"
<b>K</b>	T	N - 2"	N - 2"	N - 2"	N - 2"	Congesta - 4"
<b>L</b>	T	N - 2"				

N: Mucosas róseas/normocoradas.

TPC: Tempo de preenchimento capilar em segundos.

A-F: Grupo controle.

G-L: Grupo tratado com *Lithothamnium muelleri*.

No CON um aumento médio relevante da FR foi observado no T18, tempo no qual cinco equinos apresentaram taquipneia (FR>20mm), com máxima de 28mm. No T24 do CON expressiva taquipneia foi notada (FR=28mm), com máxima de 44mm em dois cavalos. No LITHO, por outro lado, um aumento médio na FR foi observado apenas no T24, no qual três equinos apresentaram taquipneia, com FR máxima de 32 mm.

A redução da volemia por desidratação aumenta a viscosidade sanguínea, que reduz o fluxo capilar. Nos capilares pulmonares com o aumento do edema intersticial, consequência da inflamação sistêmica, a troca gasosa fica comprometida, e um aumento do esforço e da frequência respiratória são necessários para manter a oxigenação. À vista disso, o padrão respiratório anormal e FR>30mpm são parâmetros físicos com boa predição para redução da função respiratória em equinos (McConachie et al., 2016). Portanto, apesar de não ser encontrado diferença estatística na FR, há indícios de redução da função respiratórias tanto no grupo controle quanto no grupo tratado.

De modo complementar, em um estudo clínico sobre colite aguda, os cavalos que vieram a óbito apresentaram na admissão FR mediana de 22mm, com máxima em 40mm (Urayama et al, 2018), dados que ressaltam a importância de uma discreta taquipneia no prognóstico de equinos com SISR/sepse.

Taquicardia significativa foi observada no CON nos tempos T18 (P=0,0132) e T24 (P=0,0254). Ao passo que no LITHO, um aumento relevante na FC foi observado apenas no T24.

Adicionalmente, a FC foi significativamente menor no LITHO no T18 ( $P=0,0009$ ). O aumento da FC em relação ao T0 foi de 89% no T18 e de 127% no T24 no CON, ao passo que no LITHO, a elevação foi de 78% somente no T24. Taquicardia significativa também foi observada em cavalos após administração de OF (10g/kg), contudo, com 55bpm de média no T24 (Van Eps e Pollitt, 2006).

A taquicardia em casos de distúrbios gastrointestinais ocorre como mecanismo compensatório a hipovolemia para manutenção do débito cardíaco e como reflexo do nível de dor (Barton e Peroni, 2018). A sobrecarga de OF promove uma mudança compartimental osmótica, seguida de hemoconcentração, hiperproteinemia, hipernatremia e hiperclorêmia típicas de colite moderada/grave (Moore et al., 1981; Clarke et al., 1982). A desvitalização da mucosa intestinal implica na desidratação, notável no presente estudo pela presença de diarreia. Entretanto, a hipovolemia também é observada em quadros inflamatórios sistêmicos e sépticos, e ocorre devido a fragilidade microcapilar que promove uma redistribuição de fluidos para o interstício e parênquima tecidual (Perner et al., 2018).

Ao analisar os dados existentes, é indicativo de que a disbiose por sobrecarga de OF e perda de líquido para o lúmen intestinal ocorreram de forma equivalente entre os grupos. Contudo, a repercussão sistêmica parece diferir, devido as diferenças significativas entre LITHO e CON. Por conseguinte, há indícios de que a redistribuição de fluidos em quadros inflamatórios sistêmicos decorrentes de distúrbios gastrointestinais é tão relevante quanto a perda para o lúmen intestinal, e que o *Lithothamnium muelleri* foi capaz de reduzir tais consequências da inflamação sistêmica.

De modo geral, é importante ressaltar a importância de se aferir e monitorar a FC em processos inflamatórios sistêmicos. Em um estudo anterior, cavalos com SIRS por colite aguda que não sobreviveram apresentavam FC mediana de 60bpm (mínima de 40bpm e máxima de 100bpm), ao passo que os sobreviventes apresentavam FC de 48bpm (40-60bpm) (Urayama et al., 2018). Além disso, é importante destacar que equinos admitidos na emergência com  $FC > 52$ bpm tiveram uma chance de não sobreviverem 11 vezes maior de que cavalos com  $FC < 52$ bpm (Roy et al., 2017).

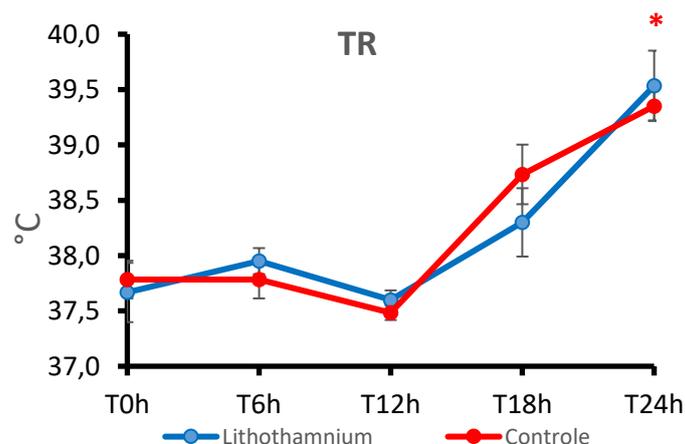
Alterações na coloração das mucosas foram observadas a partir do T12 no CON e acentuaram nos tempos seguintes, com congestão e presença de halo toxêmico. No LITHO, por outro lado,

somente no T24 foi observado congestão das mucosas. O aumento do tempo de preenchimento capilar para 4 segundos foi notado a partir do T18 no CON e apenas no T24 no LITHO. A hiperemia e congestão de mucosas indicam alterações cardiovasculares resultantes do processo inflamatório sistêmico exacerbado. Enquanto a presença de halo toxêmico já evidencia uma falha na perfusão microcapilar (Lohmann e Barton, 2010). De forma complementar, alterações na coloração das mucosas foram associadas ao risco de óbito 17 vezes maior em cavalos admitidos na emergência (Roy et al., 2017), destacando assim, a importância do parâmetro na monitoração de cavalos com SIRS.

Dois pontos importantes destoam o LITHO do CON na avaliação das mucosas: o tempo em que foi observada a primeira alteração na coloração das mucosas e aumento no TPC; e a ausência de halo toxêmico no LITHO. Tais fatores, associados aos sinais mais brandos de taquipneia e taquicardia podem ser indícios do efeito do *Lithothamnium muelleri* sob a consequente repercussão sistêmica promovida por disbiose intestinal característica em equinos submetidos ao modelo de OF (Milinovich et al., 2010). Uma vez que nenhum dos grupos foi submetido a fluidoterapia para correção da desidratação, acredita-se que o efeito do tratamento esteja mais associado à redução de efeitos inflamatórios sistêmicos produzidos pela disbiose.

### 4.3. Exame físico: Termorregulação

A febre foi observada a partir do T18 nos dois grupos estudados (Figura 11).



**Figura 11:** Médias  $\pm$  erros padrão da temperatura retal (TR) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asteriscos indicam diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. \* P=0,0126.

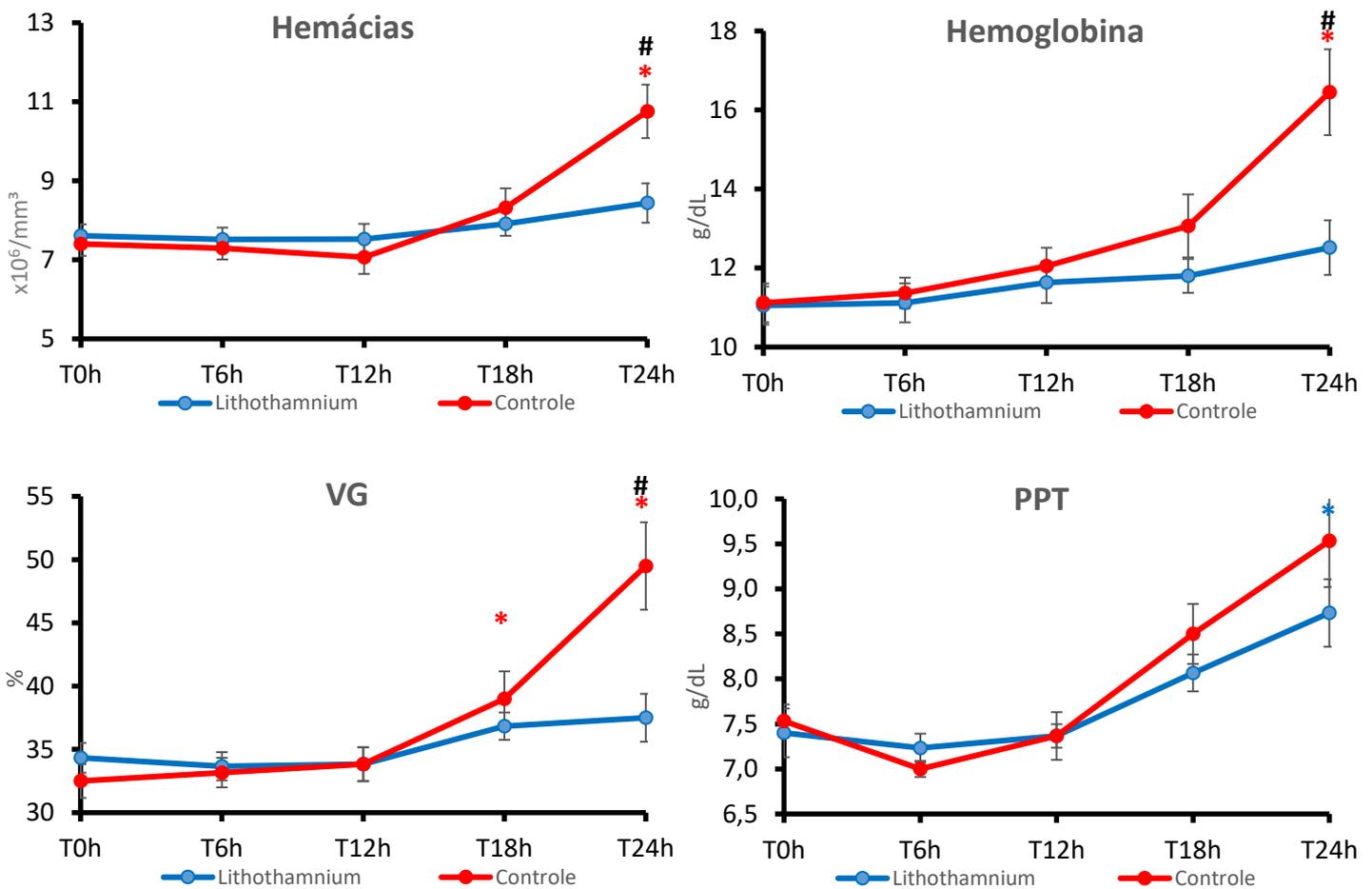
No T18, dois animais do CON apresentavam febre moderada de 39,5°C, enquanto três apresentaram sinais mais brandos (38,6°C). No grupo LITHO apenas um animal apresentou febre. De forma semelhante, estudos prévios verificaram pirexia ( $TR > 38,5^\circ\text{C}$ ) entre 14 e 18 horas após a administração de OF (10g/kg) (Van Eps et al., 2012). No T24, por outro lado, todos os equinos no CON apresentaram febre, com temperatura significativamente ( $P=0,0126$ ) maior que a basal e máxima em 39,7°C. No LITHO no T24 foi observado febre em cinco animais com máxima de 40,6°C, estando o sexto cavalo em febre branda. Na literatura, a febre variou de 39,1°C às 20 horas (Van Eps et al. 2012), chegou próximo à 40°C em 24 horas (Van Eps e Pollitt, 2006), e se estendeu até às 32 horas (Bailey et al. 2009) após a sobrecarga por OF (10g/kg).

A ocorrência de febre em equinos com distúrbios gastrointestinais é compatível com a disbiose (Milinovich et al., 2007; Milinovich et al., 2008; Milinovich et al., 2010), sendo explicada por uma resposta inflamatória sistêmica com a ativação do centro de termorregulação, promovida pela translocação de PAMPs pela mucosa intestinal. Estudos sobre os efeitos sistêmicos da sobrecarga de OF em equinos demonstraram presença de LPS circulante, além de elevações nas concentrações de citocinas inflamatórias, como o fator de TNF- $\alpha$ , e ativação plaquetária (Bailey et al., 2009).

#### **4.4. Hemograma: Hematócrito e Proteinemia**

As alterações na contagem de hemácias, na concentração de hemoglobina e proteína plasmática total e no volume globular são observadas na figura 12.

Sinais de desidratação no CON são evidentes a partir do T18 e acentuaram no T24, indicados pelo aumento no VG e PPT (Moore, 1981) e corroboram com as observações anteriores de taquicardia. Aumentos significativos no VG e PPT também foram observadas entre 16-32 horas e 20-24 horas após administração de OF, respectivamente (Van Eps e Pollitt, 2006). No LITHO, apesar de discreta hemoconcentração ser notada as alterações foram significativamente menores que as evidenciadas no CON. Apenas no T24 um aumento significativo ( $P=0,349$ ) na PPT foi evidente no LITHO e condiz com a taquicardia compensatória a desidratação observada neste momento.

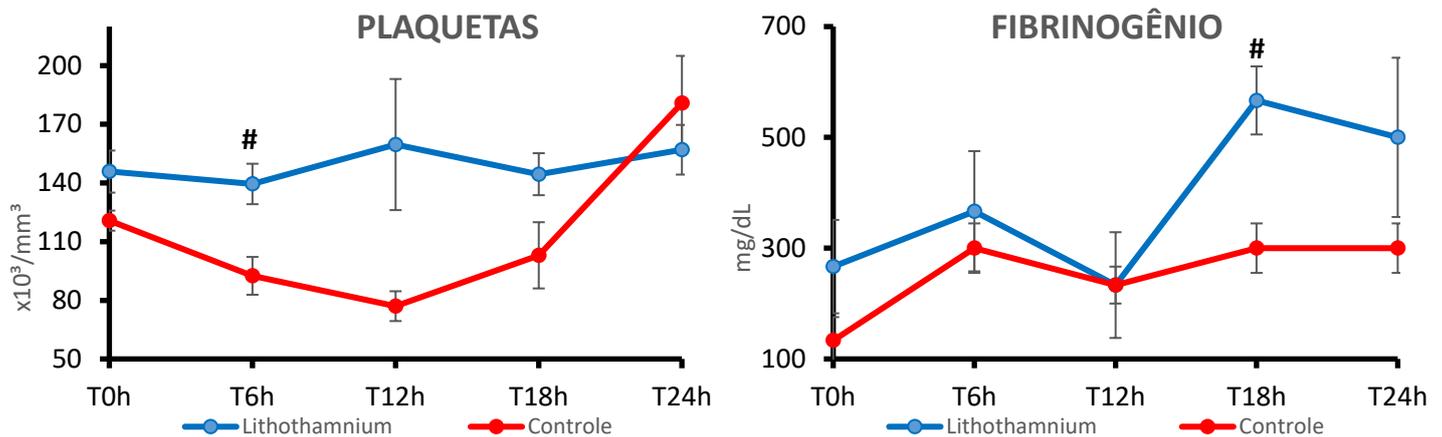


**321456528965565896589** **Figura 12:** Médias  $\pm$  erros padrão do número de hemácias, concentração plasmática de hemoglobina, hematócrito (VG) e proteína plasmática total (PPT) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Um asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. PPT: Friedman test seguido de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. #  $P < 0,02$ ; \*  $P < 0,0349$ .

Como discutido anteriormente, quadros inflamatórios sistêmicos cursam com desidratação devido à mudança compartimental de fluidos. Nos casos em que o insulto primário é gastroentérico a desidratação advém, adicionalmente, da perda de água para o lúmen intestinal devido a desvitalização da mucosa. Ressalta-se nestes processos, a importância de se monitorar e levar em consideração alterações no VG e PT. No presente estudo, ao se comparar o grupo tratado com o controle é observado mudanças na volemia e alterações cardiovasculares tardias e mais brandas no LITHO. A ausência de halo toxêmico, somado à taquicardia, desidratação e hemoconcentração postergadas no grupo tratado demonstram um provável efeito do *Lithothamnium muelleri* em amenizar as alterações sistêmicas desencadeadas pela disbiose.

#### 4.4. Hemograma: Plaquetemia e fibrinogenemia

Trombocitopenia foi notada no CON a partir do T6. Mudanças na contagem de plaquetas no LITHO não foram observadas. Hiperfibrinogenemia foi verificada apenas no LITHO a partir do T18, significativa em relação ao CON (Figura13).



**Figura 13:** Médias  $\pm$  erros padrão da contagem de plaquetas e fibrinogênio de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Hashtags indicam diferença entre grupos. Plaquetas: Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. Fibrinogênio: Friedman test seguido de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. #  $P < 0,0216$ .

No CON, trombocitopenia foi observada até o T18 após a sobrecarga de carboidratos. Tal alteração se justifica provavelmente pelo quadro séptico decorrente do distúrbio gastrointestinal, no qual a população das plaquetas tende a reduzir devido ao consumo elevado (Dallap et al., 2003). Apenas no T24 a produção de plaquetas superou o consumo. Diferentemente, no modelo de sobrecarga por amido a plaquetopenia foi observada apenas 8 horas após o início da claudicação (Moore, 1981). No LITHO foi observado normoplaquetemia durante todo o período experimental. A contagem plaquetária em média se manteve sem grandes alterações, sendo do T6 significativamente ( $P=0,0186$ ) maior que a do CON, o que indica equilíbrio entre consumo e produção. No T12 do LITHO, um desvio padrão maior da média foi notado devido dois cavalos, um com trombocitopenia ( $J = 67$  mil plaquetas/mm<sup>3</sup>) e outro com hiperplaquetemia ( $P=287$  mil plaquetas/mm<sup>3</sup>).

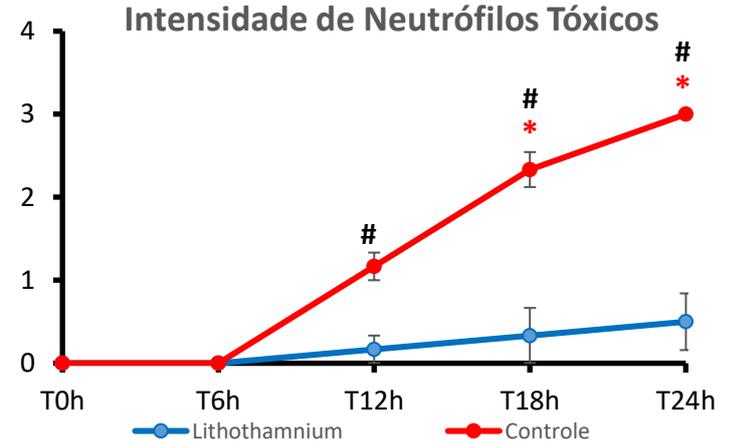
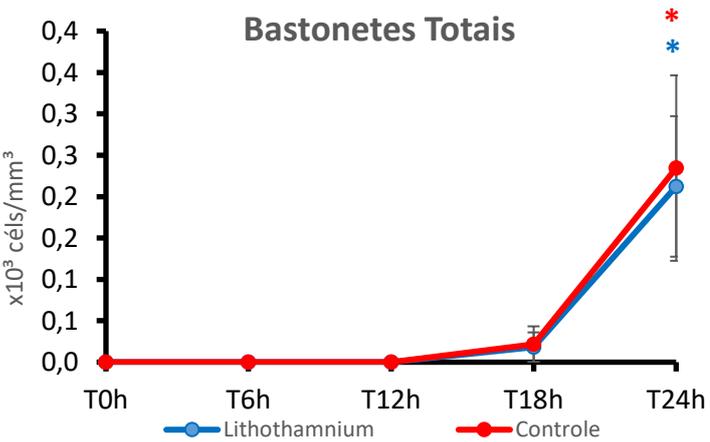
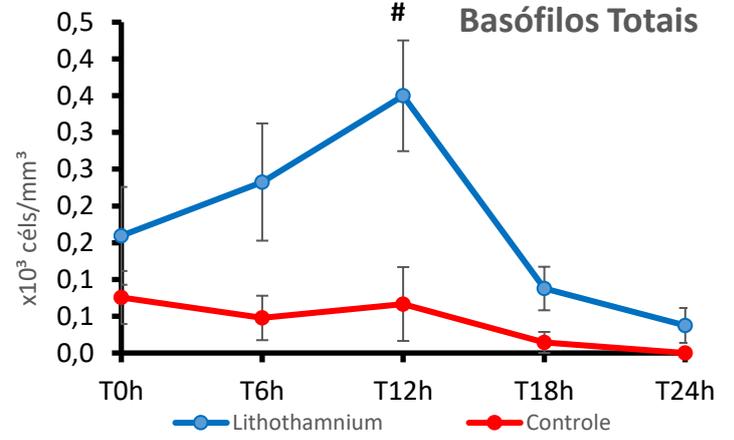
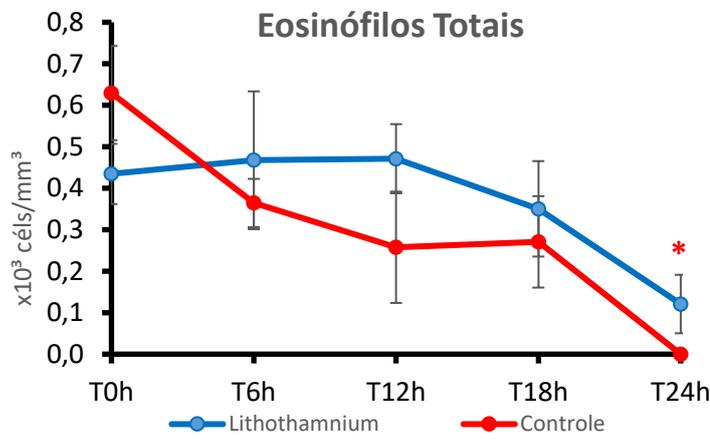
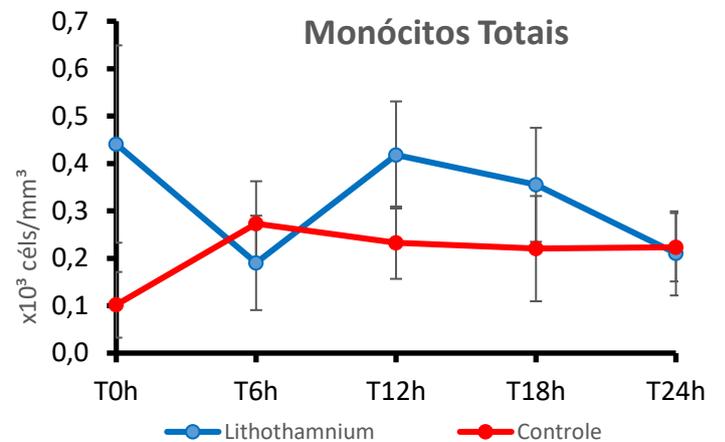
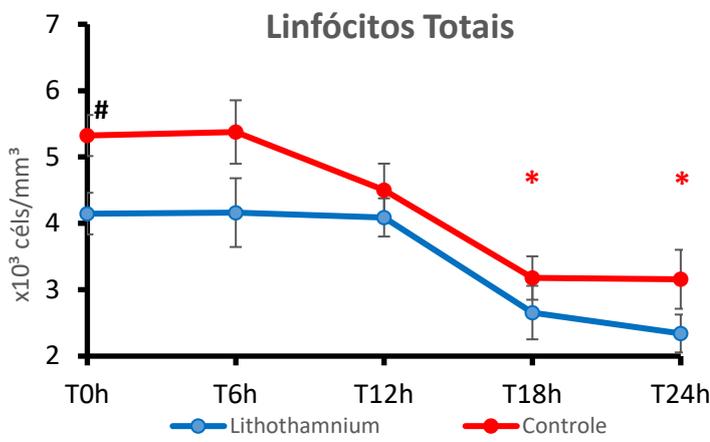
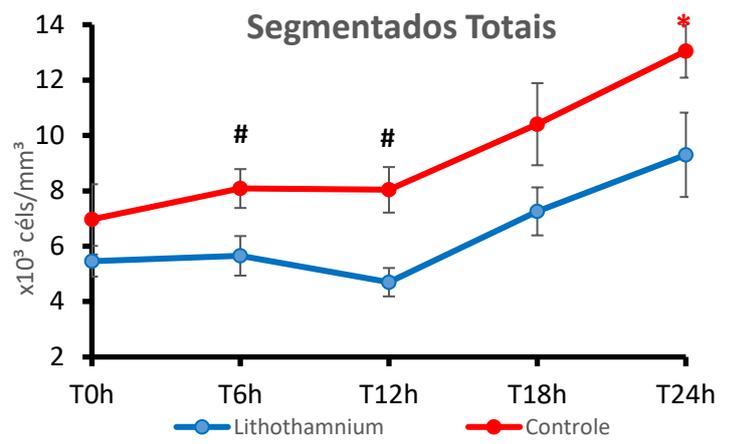
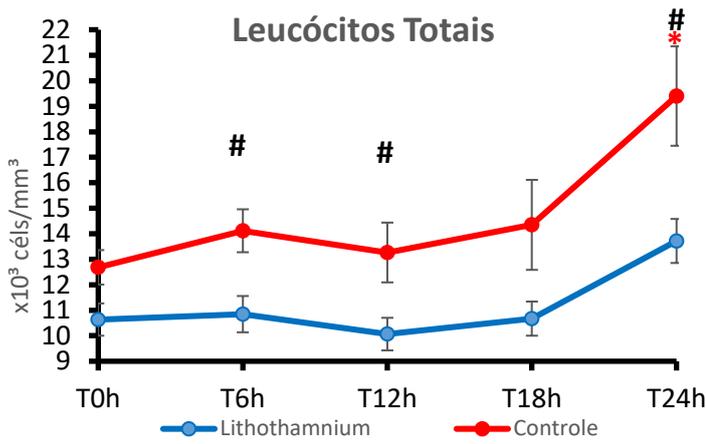
O fibrinogênio no CON dobrou no T6 e se manteve nos níveis superiores nas avaliações seguintes, não ultrapassando a referência (400 mg/dL). Hiperfibrinogenemia ligeira também foi observada por Van Eps e Pollitt (2006) em todos os cavalos, mas somente após 16 horas da

indução com OF. Hiperfibrinogenemia foi observada no LITHO a partir do T6, mas o fibrinogênio dobrou apenas no T18, com aumento médio maior em relação ao CON. A hiperfibrinogenemia tanto no CON quanto no LITHO expressa a presença de um processo inflamatório agudo, mas que não se assemelha. No LITHO, apesar de ser notado uma intensa resposta inflamatória é observado um menor consumo de plaquetas, logo menores danos vasculares provavelmente ocorreram. Similarmente, em cavalos com vólculo de cólon maior tratados cirurgicamente houve normoplaquetemia e hiperfibrinogenemia nos cavalos que sobreviveram e trombocitopenia e normofibrinogenemia nos não sobreviventes (Dallap et al., 2003).

A redistribuição de fluidos e consumo dos componentes da coagulação na inflamação sistêmica é explicado adiante. O insulto primário, como a disbiose no presente estudo, ativa a cascata inflamatória e, como resultado, há migração de leucócitos da corrente sanguínea para o foco inflamatório. A saída intensa e constante de células imunes da circulação para o tecido produz micro lesões no endotélio capilar, que ativam a cascata da coagulação para conter o dano vascular e impedir um extravasamento de fluido ou mesmo um sangramento (Stockham e Scott, 2007; Abbas et al., 2018). Uma vez que se instala um quadro de inflamação generalizada e descontrolada, há vasta e permanente lesão capilar e, conseqüente, perda de fluido para o interstício e desidratação, e consumo excessivo dos componentes da coagulação, como observado no grupo controle e tardiamente no grupo tratado.

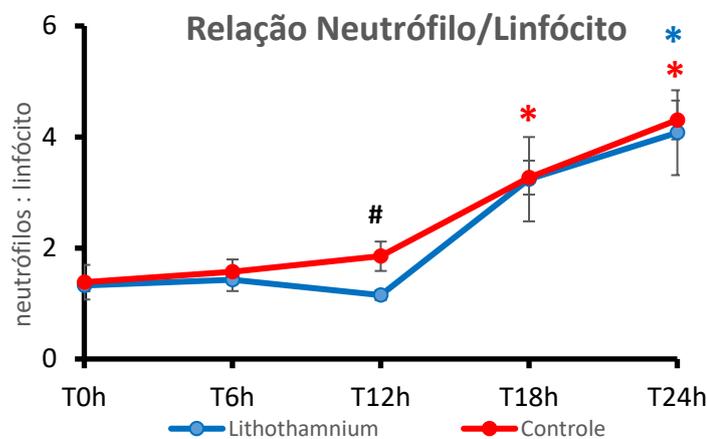
#### **4.5. Leucograma**

Significativa leucocitose por neutrofilia com desvio a esquerda foram observadas nos dois grupos. Linfopenia, eosinofilia e basofilia também foram evidenciados, contudo estatisticamente relevantes apenas no CON. Severa e intensa toxicidade de neutrófilos foi notada apenas no CON (Figura 14).



**Figura 14:** Médias  $\pm$  erros padrão da contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, bastonetes totais e classificação de toxicidade de neutrófilos (0: ausência de neutrófilos tóxicos; 1: presença considerável; 2: moderada; 3: intensa de neutrófilos tóxicos) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, Ordinary one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. Para basófilos Kruskal-Wallis test, e para intensidade de neutrófilos tóxicos Friedman test, seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,04; \* P<0,02.

A relação de neutrófilos/linfócitos elevou significativamente nos dois grupos, sendo observada diferença entre os grupos apenas no T12 (Figura 15).



**Figura 15:** Médias  $\pm$  erros padrão da relação neutrófilo:linfócito de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, Ordinary one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. # P<0,04; \* P<0,04.

Alterações na contagem de leucócitos e variações nas suas frações foram observadas no CON a partir do T6 e intensificaram nos tempos seguintes. Uma leucocitose discreta foi observada no T6 do CON por neutrofilia e monocitose. Em relação à contagem basal, aumentos de 11%, 15% e 167% foram respectivamente observados nos valores de leucócitos, neutrófilos e monócitos. No T18 do CON, apesar de significativa linfopenia (P=0,0142), foi observada leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda. A contagem de linfócitos reduziu em 40%, enquanto os neutrófilos e bastonetes elevaram em 49% e 2,1%, respectivamente, no T18. No T24 do CON, significativa leucocitose (P=0,0195) foi observada, com aumento de 52%, devido a ocorrência de neutrofilia e desvio à esquerda, significativos (P=0,0059 e P=0,0132, respectivamente). Os aumentos de neutrófilos e bastonetes no T24 corresponderam a elevações de 87% e 23% em relação à contagem basal. Mudanças significativas no perfil de leucócitos

ocorreram de forma semelhante às observadas no modelo de indução com 10g/kg de OF (Van Eps e Pollitt, 2006) e com amido (Moore, 1981).

No LITHO as alterações ocorreram de forma mais branda. Leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda foi observada somente no T24, estatisticamente menor que a observada no CON ( $P=0,0237$ ). No LITHO as variações na contagem de leucócitos, neutrófilos e bastonetes no T24 em relação ao T0 foram, respectivamente, 28%, 70% e 21%. De modo relevante, o leucograma tanto do grupo controle quanto do tratado revela um quadro de inflamação aguda severa (Stockham e Scott, 2007). Sendo, a leucocitose e a presença de bastonetes associadas com a maior mortalidade de cavalos com doença aguda (Lambert et al.,2016; Roy et al, 2017).

No estudo, foi observada a semelhança entre o tipo de resposta imune desencadeada independente do tratamento. A leucocitose por neutrofilia com linfopenia foi similar em ambos os grupos, sendo evidente a evolução da relação N:L, considerada como normal na faixa de 1,4:1, que duplicou no T18 e triplicou no T24, tanto no CON quanto no LITHO. Portanto, evidencia-se novamente uma resposta inflamatória aguda com potencial para contornar um processo infeccioso de origem bacteriana (Stockham e Scott, 2007).

Contudo, destaca-se a diferença entre a gravidade da resposta inflamatória e a ativação de neutrófilos desencadeada em cada grupo frente a sobrecarga de OF. No T12 do CON foi observado incidência considerável de neutrófilos tóxicos (NT) em 5/6 cavalos. Presença significativa de NT foi evidente no T18 do CON ( $P=0,0067$ ). Ao passo que, no T24 do CON, todos os cavalos apresentavam sinais de toxicidade em quase todos os neutrófilos ( $P=0,0016$ ), portanto, com expressiva inflamação sistêmica. Por outro lado, no LITHO, apesar da presença de NT ter sido observada a partir do T12 em 1/6 cavalos, em todos os tempos a intensidade de NT foi significativamente menor que a observada no CON (T12  $P=0,0130$ , T18  $P=0,0108$  e T24  $P=0,0095$ ). A toxicidade de neutrófilos é visível pelas mudanças nos componentes citoplasmáticos desencadeadas pela ativação leucocitária, para montar uma resposta ao invasor.

A quantidade de neutrófilos tóxicos na circulação é considerada como importante indicativo da gravidade do processo infeccioso, podendo chegar a quase a totalidade de neutrófilos com sinais de toxicidade (Stockham e Scott, 2007). Em equinos essas alterações são de extrema importância, uma vez que a quantidade e o grau de toxicidade de neutrófilos estão associados com mortalidade na ocorrência de doença aguda (Lambert et al.,2016). Portanto, ao se comparar

as respostas imunes do CON e LITHO é possível verificar que apesar de haver uma resposta imune montada de forma similar, no LITHO a gravidade e a velocidade de resposta destoam do CON. No LITHO é clínica e estatisticamente observado uma resposta imune mais branda e com menor citotoxicidade. Estas notas, implicam que o *Lithothamnium muelleri* apresenta propriedades eficazes em regular a resposta inflamatória. Efeitos protetores similares já foram demonstrados com o uso de *Lithothamnium muelleri* em outras espécies, incluindo efeitos imunomodulador (Rezende et al., 2013) e regulador da ativação endotelial e leucocitária (Soares et al., 2012).

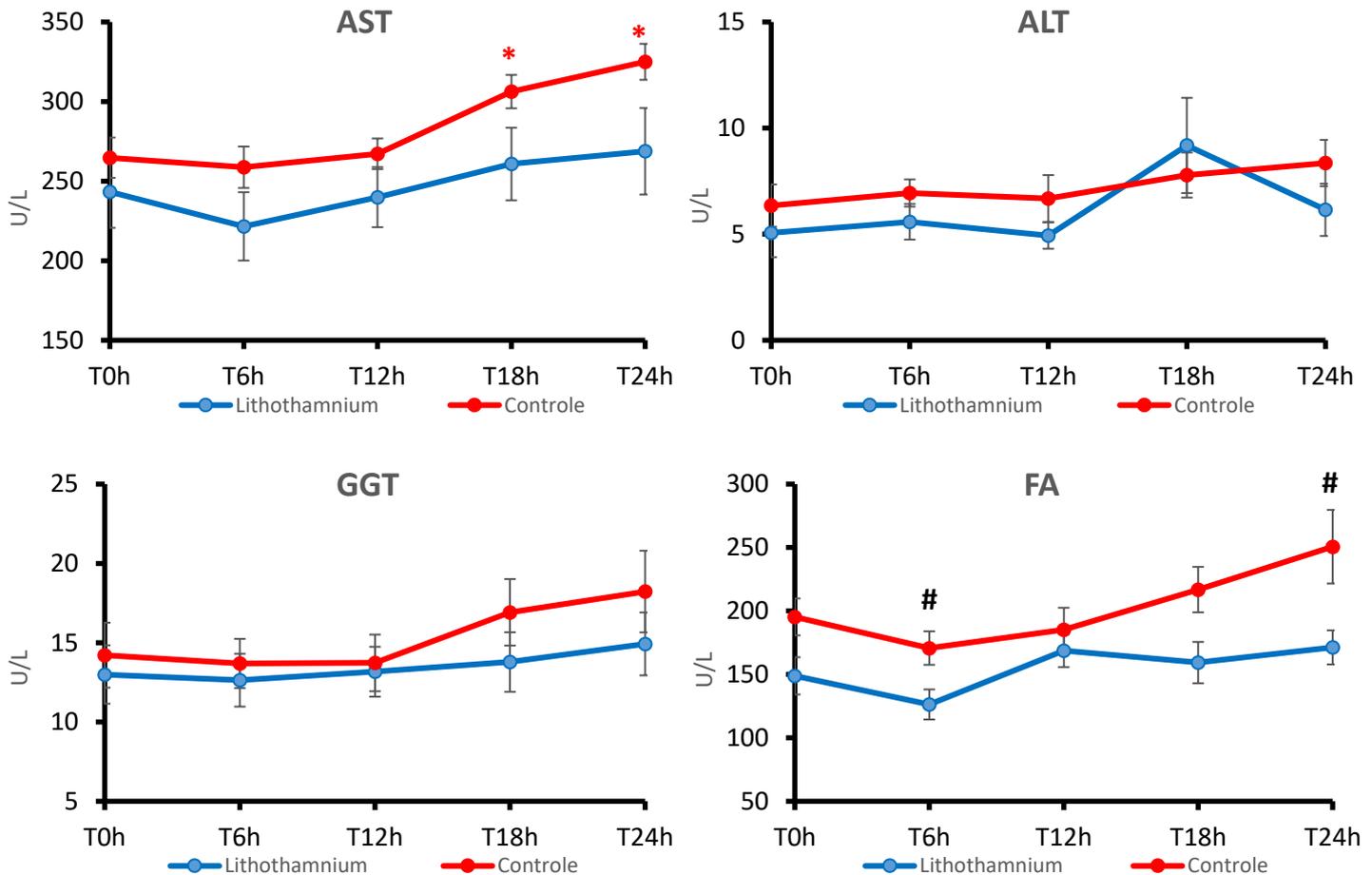
#### 4.6. Sepsis

Apesar da evidente diferença entre os grupos do presente estudo, é notória o desenvolvimento de taquicardia, taquipneia, febre e leucocitose. No CON a ocorrência de sepsis foi identificada a partir do T18 (FC=  $70 \pm 14$  bpm; FR=  $21 \pm 2$  mpm; TR=  $38,7 \pm 0,66^\circ\text{C}$ ; CL=  $14.300 \pm 4.321$  céls/mm<sup>3</sup>), enquanto no grupo tratado essa só foi caracterizada no T24 (FC=  $66 \pm 23$  bpm; FR=  $23 \pm 9$  mpm; TR=  $39,5 \pm 0,78^\circ\text{C}$ ; CL=  $13.717 \pm 2.116$  céls/mm<sup>3</sup>). A presença de disbiose, taquicardia, taquipneia, febre e leucocitose determinam o quadro séptico em ambos os grupos avaliados, mas com expressiva diferença temporal e na gravidade entre eles. Apesar do similar distúrbio gastrointestinal desencadeado pela administração gástrica de OF, ressalta-se a significativa diferença entre os grupos na repercussão sistêmica, com taquicardia, taquipneia e leucocitose significativamente menores no LITHO, demonstrando o potencial efeito protetor do *Lithothamnium muelleri* em equinos com disbiose.

A definição de sepsis para cavalos adultos na medicina equina se baseia nos critérios base (taquicardia, taquipneia ou hipoventilação, hipo ou hipertermia e leucocitose ou desvio a esquerda >10%) estabelecidos em 1992 para humanos (Bone, 1992; Barton e Peroni, 2018). Apesar de modificações nas definições e parâmetros de referência na medicina humana, com atual reconhecimento de sepsis havendo disfunção orgânica (Singer et al., 2016), os critérios base fornecem melhor sensibilidade, o que é fundamental no tratamento de pacientes críticos para se iniciar o tratamento de suporte precocemente.

#### 4.7. Bioquímica sérica: Função hepática

Aumento na concentração sérica de ALT, AST, FA, GGT e bilirrubinas foram observadas no CON e discretamente no LITHO, sendo em alguns momentos as concentrações no LITHO, significativamente menores que as do CON (Figuras 16 e 17).



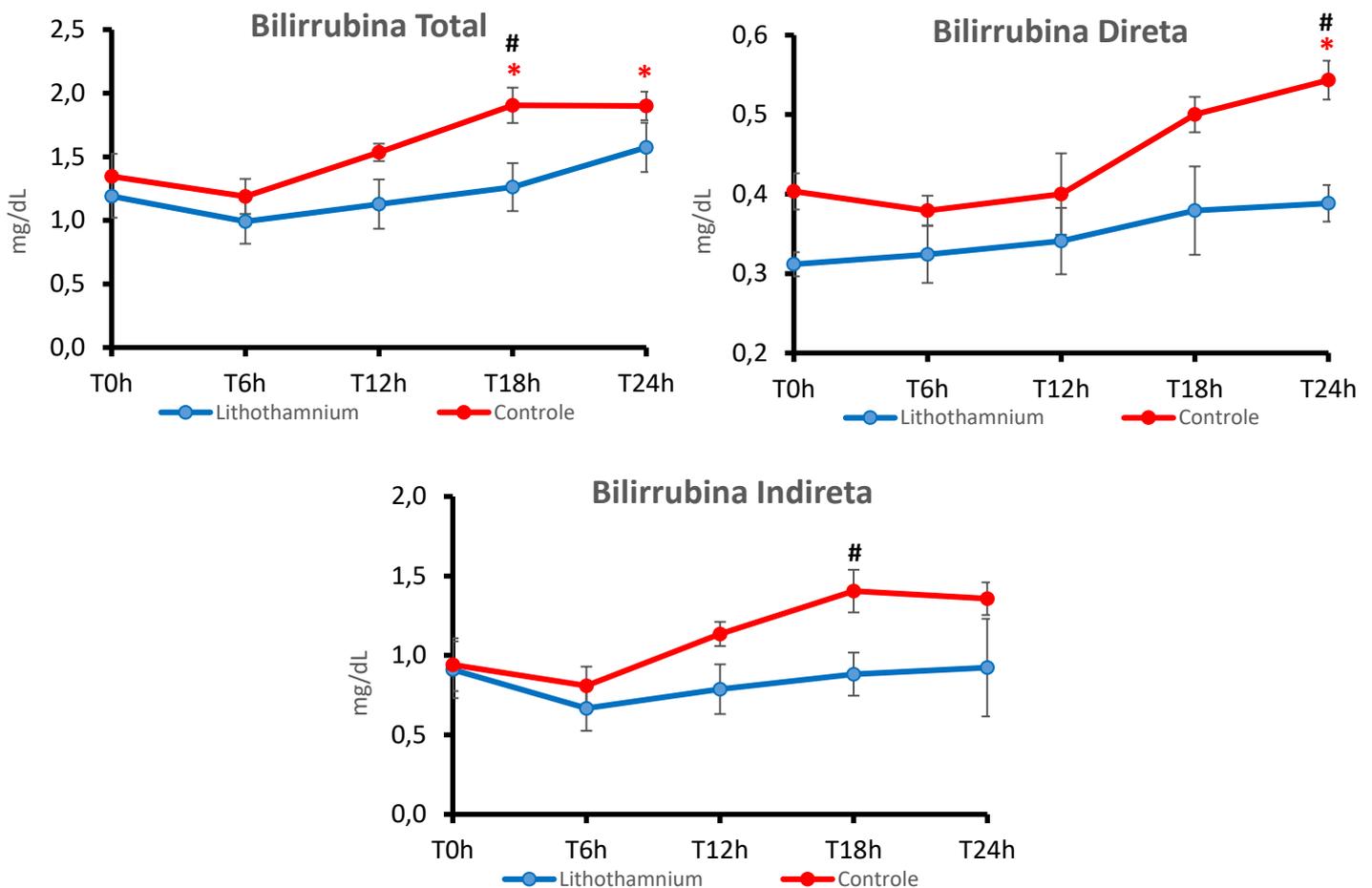
**Figura 16:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase (GGT) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. AST: Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. ALT, FA e GGT: Friedman test, seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. #  $P < 0,0260$ ; \*  $P < 0,0004$ .

Os biomarcadores alteraram a partir do T18 tanto no CON quanto no LITHO. Significativo aumento foi observado no T18 ( $P=0,0004$ ) e T24 ( $P=0,0003$ ) nas concentrações de AST no CON, com aumentos correspondentes a 15% e 22% ao valor basal, respectivamente. De forma complementar, um aumento de 23% na ALT foi observado no T18 e de 33% no T24 do CON.

Adicionalmente, no CON elevação de 11% e 28% na FA e de 19% e 28% no GGT foram respectivamente observados no T18 e T24. No LITHO, por outro lado, um aumento de 29% e 7% foi observado na ALT e AST, respectivamente, no T18. No T24, o aumento em relação ao valor basal de ALT foi de 19% e de AST de 10%. Alterações nas concentrações de FA e GGT ocorreram, mas discretamente.

Apesar de um aumento na concentração dos biomarcadores de lesão hepática ser observado em ambos os grupos, observa-se a permanência dentro do valor de referência para a espécie (Meyer, 1995). Entretanto, é importante ressaltar que a constatação de incrementos sucessivos nos biomarcadores já pode ser considerada como indicadora de disfunção e de iminente lesão do órgão alvo. Assim sendo, apenas o aumento significativo na AST do CON sustenta a ocorrência de disfunção hepática, mais discreta e lenta no LITHO. Como referência na clínica médica de equinos, vale ressaltar que o AST foi o único biomarcador hepático aumentado em um estudo clínico de cavalos com pleuropneumonia que vieram ou não à óbito. Neste estudo verificou-se AST mais alta no grupo não sobrevivente (243mg/dL) do que no sobrevivente (179mg/dL) (Arroyo et al. 2017). Deste modo, vale salientar a importância de um discreto aumento em biomarcadores de lesão hepática ou mesmo da proximidade da concentração à máxima do valor de referência em pacientes em quadros de SIRS/Sepse.

Os principais indicadores de lesão nos hepatócitos são as AST e ALT. A AST, por mais que não seja específica, nos equinos é encontrada no citoplasma dos hepatócitos e uma vez ocorrendo lesão, seus níveis aumentam, sendo para espécie umas das principais enzimas de perfil hepático. Dentre os principais indicadores de lesão nos canalículos biliares estão a FA e a GGT (Meyer, 1995).



**Figura 17:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de bilirrubina total, direta e indireta, de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. #  $P < 0,0470$ ; \*  $P < 0,0207$ .

As alterações nas concentrações de bilirrubina variaram dentro do valor de referência, mas houve variações estatisticamente relevantes. Um aumento de 50% na concentração de BI no T12 do CON resultou em 14% de elevação da BT. No T18 um aumento de 72% na BI e de 25% na BD promoveu a adição significativa de 41% na BT do CON ( $P=0,0443$ ). Ao passo que no T24, a elevação de 44% em BI e significativa de 35% em BD ( $P=0,0246$ ), promoveram o aumento significativo de 40% da BT ( $P=0,0470$ ). Por outro lado, no LITHO, as principais alterações ocorreram na BD no T24, mas a concentração foi significativamente menor que a do CON ( $P=0,0027$ ). Um aumento de 22% na concentração de BD foi observado no T18 do LITHO, resultando em elevação de 5% na BT, sem alterações na BI. No T24, um aumento de 30% na BI foi então observado, somado a 25% a mais de BD, culminou em elevação de 31% da BT.

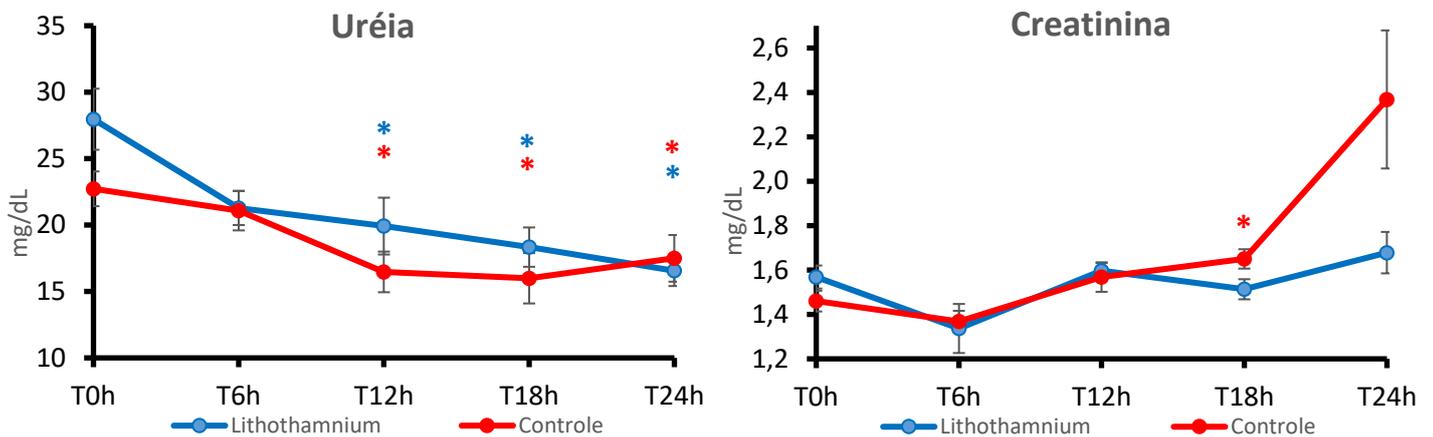
O acúmulo de BI é condizente com uma redução de conjugação hepática e indicativo de perda de função (Stockham e Scott, 2007). Ao passo que o acúmulo de BD condiz com obstrução de canalículos ou em cavalos indica inapetência. Nos quadros de inapetência, se observa um intenso aumento de BD e conseqüentemente de BT e secundariamente um discreto aumento de BI. Portanto, no presente estudo, apesar da variação dentro da referência, no CON foi verificado importante aumento de BI no T12, que culminou no aumento de BT, indicativo de sobrecarga ou de disfunção hepática. A partir do T18, um aumento na BD também foi observado e poderia ser resultante da anorexia. No LITHO, por outro lado, as principais alterações ocorreram na BD e BT, com mudanças nas concentrações da BI apenas no T24, indicando primariamente uma inapetência e em menor grau disfunção hepática.

Em um estudo clínico, cavalos com pleuropneumonia que vieram a óbito apresentaram BT (mediana de 4,6 mg/dL) maior que cavalos que sobreviveram (2,5 mg/dL), sendo o aumento da BT associado ao risco mais alto de morte (Arroyo et al. 2017) e, portanto, um importante biomarcador para se avaliar a função do fígado. Em vista disso, verifica-se a relevância da determinação de BT também no presente estudo, uma vez a BT alterou significativamente a partir do T18 no CON.

Portanto, apesar de discretas alterações, o aumento significativo nas concentrações de AST e BT, a partir do T18 no grupo controle, indicam ocorrência de lesão e redução da função hepática como consequência da disbiose induzida. Além disso, é possível verificar que o uso de *Lithothamnium muelleri* foi capaz de retardar e amenizar tais complicações sistêmicas da sobrecarga de carboidratos.

#### 4.8. Bioquímica sérica: Função renal

Significativa hipouremia foi observada a partir do T12 nos dois grupos estudados, ao passo que, hipercreatinemia foi notada apenas no CON (Figura 18).



**Figura 18:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de ureia e creatinina de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. \*  $P < 0,03$ .

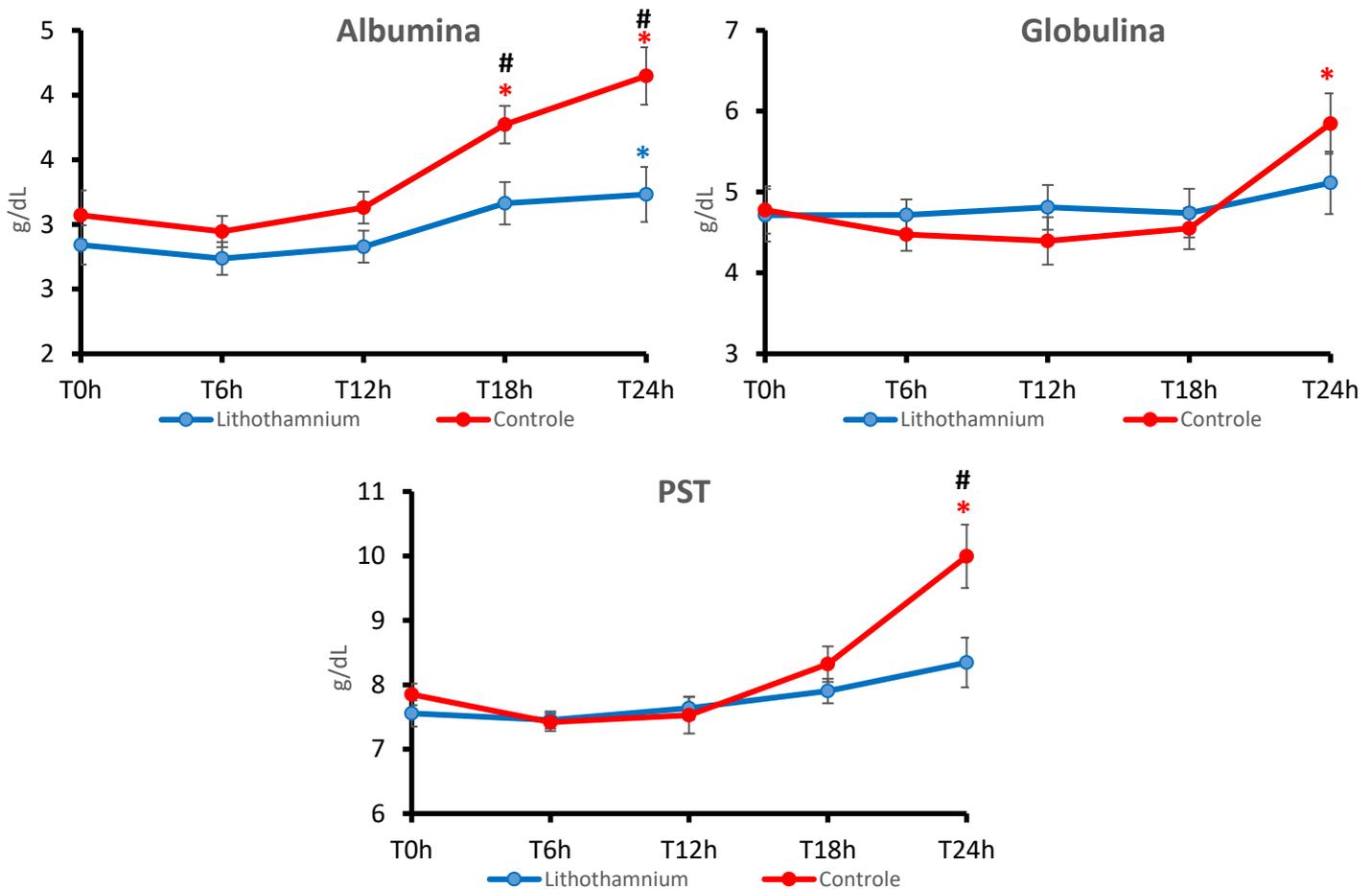
Hipouremia significativa em todos os momentos a partir do T12 foi observada tanto no CON quanto no LITHO. No CON a diminuição foi de aproximadamente 27%, ao passo que no LITHO já no T6 as concentrações de ureia reduziram 23%, chegando a reduzir 41% no T24, em relação à concentração basal. A ureia é sintetizada a partir da amônia ( $\text{NH}_3$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) no fígado e é eliminada nos rins (Meyer, 1995). A produção de ureia produz como resultado final 2 íons  $\text{H}^+$ , que automaticamente titulam 2 íons  $\text{HCO}_3^-$ . Um dos mecanismos de regeneração de bicarbonato é através da excreção do íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) nos rins. Em casos de acidose, a eliminação do íon amônio pode aumentar de 5 a 10 vezes na urina, em detrimento de regenerar o bicarbonato no rim (DiBartola, 2012). Portanto, o aumento da excreção de amônia no rim para regeneração do bicarbonato, reduzindo a demanda hepática para produção de ureia a partir de  $\text{NH}_3$ , poderia justificar a redução significativa de ureia após 12 horas da sobrecarga de oligofrutose. Adicionalmente, a baixa conversão da amônia em ureia, logo hipouremia, também é observada nas disfunções hepáticas (Klein, 2013). Como os sinais de disfunção hepática só foram notados a partir do T18, a primeira explicação seria a explicação mais plausível para justificar a hipouremia observada. Além disso, a redução de ureia também é

observada em longos períodos de baixa ingestão proteica (Stockham e Scott, 2007), e consequente redução do subproduto ( $\text{NH}_3$ ) gera redução de ureia, mas que não é observado em casos agudos com o estudado. De modo interessante, cavalos com pleuropneumonia apresentavam hipouremia severa no grupo sobrevivente (mediana de 13mg/dL) e discreta no grupo que não sobreviveu (mediana de 21mg/dL) (Arroyo et al., 2017). Tomados em conjunto, esses resultados indicam a importância do mecanismo de regeneração renal do  $\text{HCO}_3^-$  a partir da excreção de  $\text{NH}_4^+$ , para manutenção da homeostase e regulação ácido-base em equinos com sepse.

Os níveis de creatinina elevaram significativamente em relação a concentração basal de creatinina no T18 ( $P=0,0239$ ), não observada no T24, provavelmente devido ao alto desvio padrão. Enquanto no LITHO houve discreto aumento apenas no T24. Normalmente as aferições conjuntas de ureia e creatinina são usadas para se determinar uma disfunção renal, contudo as alterações na concentração de ureia sofreram modificações por outras vias e foram desconsideradas na análise de função renal. As alterações na concentração sérica de creatinina, revelaram um acúmulo gradual do metabólito no organismo ao longo do tempo podendo indicar uma redução de função renal. Apesar de variação discreta, alta creatinina em cavalos com pleuropneumonia foi associada a chance 5 vezes maior de óbito (Arroyo et al, 2017). Apesar de discretas, as variações na concentração de creatinina no CON são indicativas de disfunção renal, enquanto no LITHO o uso de *Lithothamnium muelleri* parece amenizar as consequências renais de uma disbiose.

#### 4.8. Bioquímica sérica: Proteína sérica total, albumina e globulina

Hiperproteinemia por hiperalbuminemia e hiperglobulinemia significativa foram observadas no CON, aumentos discretos forma notados no LITHO, mas significativamente menor que do CON (Figura 19).



**Figura 19:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de albumina, globulina e proteína total (PT) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. #  $P < 0,03$ ; \*  $P < 0,04$ .

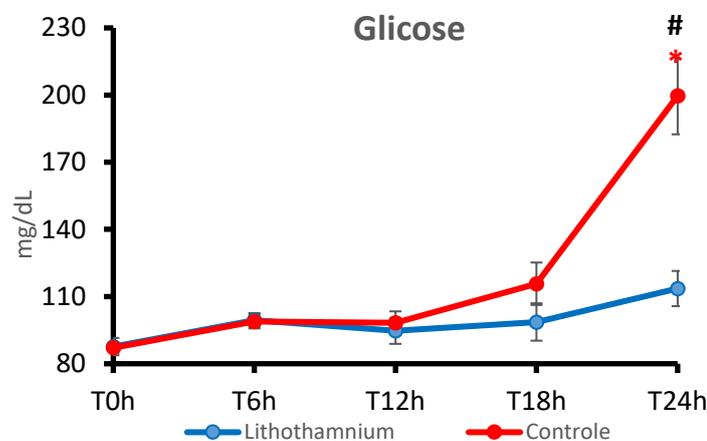
A curva de aumento da PST acompanhou a PPT, mas mostrou de modo claro significativa elevação no T24 do CON ( $P=0,0089$ ), sendo a concentração do LITHO estatisticamente menor ( $P=0,0249$ ). Em relação à GLB, nos tempos T6, T12 e T18 do CON foi verificada uma discreta redução causada por variações individuais momentâneas. No T24 do CON, um aumento significativo ( $P=0,0084$ ), correspondente a 22 % em relação ao T0, na concentração de

globulinas séricas foi observado. No LITHO, mínimas alterações foram observadas na PST e GLB.

Em relação à ALB, um aumento significativo foi evidente no T18 ( $P=0,0249$ ) e T24 ( $P=0,0225$ ) no CON. No LITHO apesar de ser observado um aumento significativo na ALB no T24 ( $P=0,0398$ ), a concentração foi significativamente menor que a notada no CON no T18 ( $P=0,0195$ ) e no T24 ( $P=0,0137$ ). As curvas de ALB se assemelham às do hematócrito (VG), e evidenciam a desidratação decorrente da disbiose por sobrecarga de carboidratos, com diferenças notórias entre os grupos. Em resumo, mudanças na homeostase e distribuição de fluidos foram observadas no LITHO, significativamente menores que as evidenciadas no CON, reiterando os efeitos benéficos do uso do *Lithothamnium muelleri*.

#### 4.9. Bioquímica sérica: Glicemia

Hiperglicemia significativa foi observada no T24 do CON, aumento discreto foi notado no LITHO, mas significativamente menor que a do CON (Figura 20).



**Figura 20:** Médias  $\pm$  erros padrão da concentração sérica de glicose de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, RM one-way ANOVA seguida de Tukey's multiple comparisons test e Unpaired t test. #  $P<0,0040$ ; \*  $P<0,0011$ .

No presente estudo, a glicemia se elevou consideravelmente no T18 do CON, com máxima em 144 mg/dL. No T24, significativa hiperglicemia foi observada no CON ( $P=0,0040$ ), com aumento de 129% em relação à basal, com máxima em 275 mg/dL. No LITHO, por outro lado, apenas um aumento discreto de 29% na glicemia foi notado no T24, significativamente menor

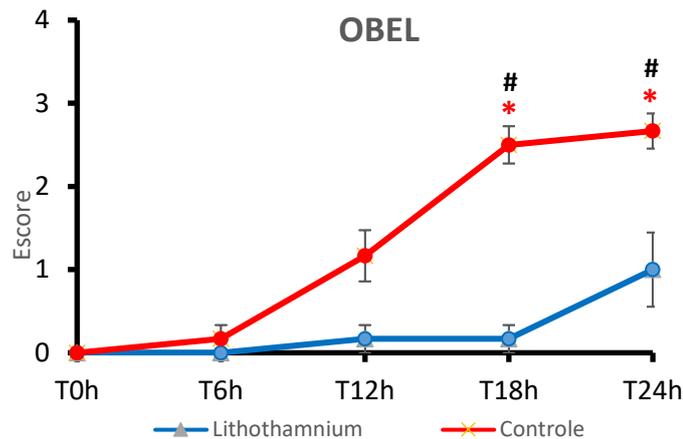
( $P=0,0011$ ) que a do CON. Estudos prévios detectaram desordens significativas na dinâmica da glicose em cavalos induzidos à laminite com OF nas doses de 5-7,5 g/kg (Kalck et al, 2009) e 10g/kg (Van Eps e Pollitt, 2006), que persistiram até 48 horas. Contudo, a glicemia média 24 horas após a indução foi de 130 mg/dL (Van Eps e Pollitt, 2006), ao passo que no presente estudo foi observada média de 199,7 mg/dL no T24 do CON.

Um estudo anterior, verificou um aumento significativo na glicose iniciando juntamente com as alterações da inflamação sistêmica, antes do início da laminite, o que supostamente poderia implicar da hiperglicemia ser um fator causal complementar no desencadeamento da laminite por sobrecarga de carboidratos (Kalck et al., 2009). Diferentemente ao observado neste estudo, no qual os primeiros sinais de Obel 1 foram observados no T6 do CON, 12 horas antes das primeiras alterações consideráveis na glicemia.

A hiperglicemia em casos avançados de sepse geralmente ocorre em detrimento da resposta do organismo a lesão e infecção. Há liberação de glicocorticóides e catecolaminas devido ao estresse, que juntamente com as próprias citocinas inflamatórias atuam endogenamente promovendo gliconeogênese hepática e resistência periférica à insulina, e portanto, promovem o aumento intenso da glicemia (Aleman e Guerrero, 2018). Deste modo, é evidenciado no presente estudo, um potencial efeito benéfico do *Lithothamnium muelleri* na manutenção da homeostase do metabolismo energético frente a desafios gastrointestinais em cavalos.

#### **4.10. Claudicação**

A claudicação característica da laminite foi observada inicialmente no T6 do CON e intensificou gradual e significativamente até o T24. No LITHO, por outro lado, a laminite foi observada a partir do T12 e acentuou consideravelmente apenas no T24, significativamente mais branda que a observada no CON (Figura 21).



**Figura 21:** Médias  $\pm$  erros padrão do grau de laminite segundo Obel (1948) de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asteriscos indicam diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Friedman test seguido de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. #  $P < 0,0216$ ; \*  $P < 0,0191$ .

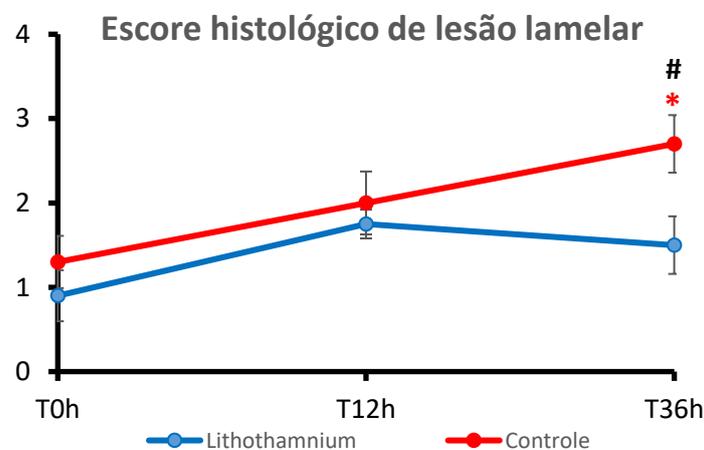
Os primeiros sinais de laminite foram observados no T6 do CON em 1 cavalo, o qual apresentou troca incessante de apoio entre os membros (Grau Obel 1). Claudicação evidente tão precocemente quanto a observada no modelo de indução de laminite com BWE (<12 h) (Minnick et al., 1987). No T12 do CON, três equinos manifestaram alterações na marcha, característica de “pisar em ovos” (Grau Obel 2), e dois mantiveram Obel 1. De maneira semelhante, num estudo prévio, foram observados os primeiros animais com grau Obel 2 16 horas após a administração de OF (10g/dL) no grupo tratado com heparina (Uberti et al., 2010).

No T18 significativa claudicação foi notada no CON ( $P=0,0191$ ), momento em que todos os cavalos já apresentavam laminite grau Obel 2 (4/6) ou Obel 3 (2/6), com relutância para mover e resistência a tentativas de levantar o membro. Por outro lado, sinais condizentes com o grau Obel 2 foram inicialmente detectados às 20 horas após a administração de doses mais baixas de OF (Tadros et al., 2012). No T24 quatro equinos do CON apresentavam grau Obel 3, enquanto os outros, Obel 2, com claudicação estatisticamente diferente da basal ( $P=0,0073$ ). Distintamente de outros estudos, nos quais sinais condizentes com laminite foram notados entre 15-20 horas após a indução com OF (Keller et al. 2011; Bailey et al. 2009; Van Eps et al. 2012) ou somente após 24 horas da administração (Van Eps e Pollitt 2006; Milinovich et al 2006; Belknap et al. 2007; Van Eps e Pollitt 2009b), sendo a laminite clinicamente diagnosticada conforme descrito por Van Eps e Pollitt (2004).

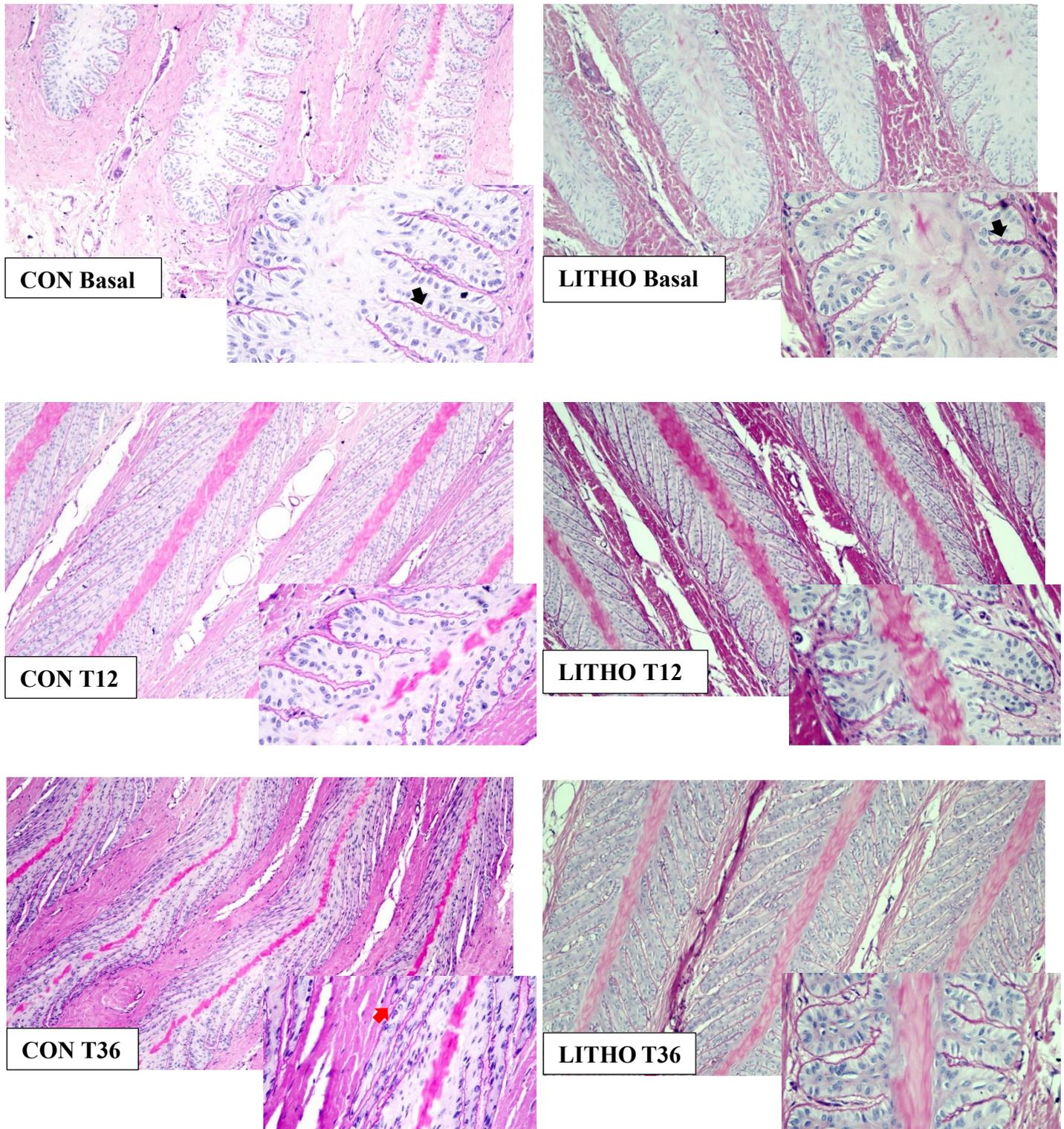
Contrapondo ao CON, no LITHO somente um animal apresentou grau Obel 1 de claudicação no T12 e T18, e no T24 apenas dois equinos apresentaram Obel 2 e outro Obel 1. O grau de claudicação do LITHO foi significativamente menor que o do CON no T18 ( $P=0,0022$ ) e T24 ( $P=0,0216$ ). Tais resultados demonstram que a suplementação com *Lithothamnium muelleri* retardou e amenizou os sinais clínicos de dor da laminite induzida por sobrecarga de OF. A incidência de laminite comumente está relacionada à gravidade da doença primária (Eades, 2017). É evidente neste estudo, alterações sistêmicas e claudicação tardia e mais branda no LITHO. No entanto, é importante ressaltar que existe um grau de variabilidade entre os cavalos quanto a suscetibilidade a LRS (Eades, 2017), e por isso variações individuais na intensidade da sepse e laminite foram observadas nos dois grupos avaliados.

#### 4.11. Histopatologia lamelar

A lesão lamelar aumentou progressiva e significativamente no CON e se manteve no T36 no LITHO (Figura 22 e 23).



**Figura 22:** Médias  $\pm$  erros padrão do escore de lesão lamelar de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, Kruskal-Wallis test seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. #  $P<0,04$ ; \*  $P<0,05$ . grupos. Teste de Normalidade, Kruskal-Wallis test seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. #  $P<0,04$ ; \*  $P<0,05$ .



**Figura 23:** Fotomicrografia da seção transversal da parede dorsal das lamelas epidérmicas primárias e secundárias de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. CON: grupo controle. LITHO: grupo tratado com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Os tecidos são corados com ácido periódico - reagente de Schiff (PAS) para destacar a MB. Na **histologia basal** as LEP e LES são observadas em formato padrão, estando as LES pontualmente alongadas. As CEBL com núcleo em sua maioria oval, centralizado e com eixo perpendicular a MB. A MB conexas entre as LES e LDS com pontuais enrugamentos (seta preta). No **T12**, é observado a maioria

dos núcleos da CEBL arredondados e no CON as LES e LEP em sua maioria alongadas e algumas LES com pontas afiladas. No **CON T36**, quase a totalidade dos núcleos das CEBL estavam arredondados, posicionados próximos e paralelamente à MB. As LES e LEP em maioria estavam alongadas e algumas LES afiladas. O desprendimento da MB em forma de “teta” (seta vermelha) e severo enrugamento foram ainda observados. No **LITHO T36**, apesar da maioria dos núcleos das CEBL estarem arredondados, a estruturação celular se manteve normal, com posicionamento do núcleo centralizado e perpendicular a MB, maioritariamente. Alongamento das LES também foi evidente. Aumento das fotomicrografias 10X e 40X.

Na histologia basal um padrão morfológico e estrutural da junção lamelar dorsal do casco foi observado. LEP e LES em formato padrão, estando as LES pontualmente alongadas em todos os cavalos. CEBL com núcleo em sua maioria oval, centralizado e com eixo perpendicular a MB. MB conexa entre as LES e LDS com pontuais enrugamentos. No T12, um discreto aumento no escore histológico de lesão lamelar foi notado tanto no CON quanto no LITHO. No T12 do CON, em torno de 70% dos núcleos da CEBL apresentavam-se arredondados, aproximadamente 53% dos núcleos estavam posicionados normalmente na célula e perpendicular à MB, e as LES e LEP em sua maioria estavam alongadas e algumas LES com pontas afiladas. No CON, sinais primários de desprendimento da MB foram identificados em dois animais, como o desprendimento pontual da MB em forma de “teta” na ponta da LES e o enrugamento moderado a severo de toda a MB. Ademais, foi observado dilatação dos capilares na LDS no T12 do CON. De forma similar, as primeiras alterações histológicas consistentes com o desenvolvimento de laminite foram observadas 12 horas após a indução com OF (Milinovich et al., 2008). Assim como, a lamelar em andamento com a laminite clínica também foi evidenciada 24-30 horas após sobrecarga com OF (10g/kg), momentos após a detecção de troca de apoio entre os membros e os primeiros sinais de claudicação durante a caminhada em reta e em círculo (Nourian et al., 2007). No LITHO por outro lado, apenas a maioria dos núcleos das CEBL estavam arredondados, as LES alongadas, e um enrugamento moderado da MB foi observado no T12.

No T36 lesões significativas foram encontradas na histologia lamelar dos cavalos CON ( $P=0,0470$ ). Quase a totalidade dos núcleos das CEBL estavam arredondados, posicionados próximos e paralelamente à MB. As LES e LEP em maioria estavam alongadas e algumas LES afiladas. O desprendimento da MB em forma de “teta” e severo enrugamento foram ainda observados em três cavalos. A dilatação intensa dos capilares da LDS também foi notada neste momento CON. No T36 do LITHO, apesar da maioria dos núcleos das CEBL estarem arredondados, a estruturação celular se manteve normal, com posicionamento do núcleo centralizado e perpendicular a MB, maioritariamente. As LEP apresentaram alongamento em

três cavalos. Apenas um equino no LITHO teve severo alongamento das LES e enrugamento da MB. O restante dos cavalos LITHO apresentaram discreto enrugamento da MB e leve a moderada dilatação dos capilares da LDS. A lesão lamelar no T36 do LITHO foi significativamente menor que a do CON ( $P=0,0303$ ). Esses achados condizem com estudos prévios, associados à estágios iniciais de laminite aguda, e incluem o afinamento e o desprendimento ocasional da MB da ponta da LES (Bailey et al., 2009).

De forma interessante não foram observadas alterações histológicas clássicas de lesão na MB em todos os cavalos com claudicação no CON e em nenhum equino com laminite clínica no LITHO. Estas observações já foram descritas anteriormente, e ocorrem porque no período inicial de desenvolvimento da laminite a lesão lamelar é naturalmente mais localizada e nem sempre a biópsia pode amostrar cem por cento da superfície lamelar dorsal, podendo a amostra ou o corte não ter alterações evidentes (Milinovich et al., 2007).

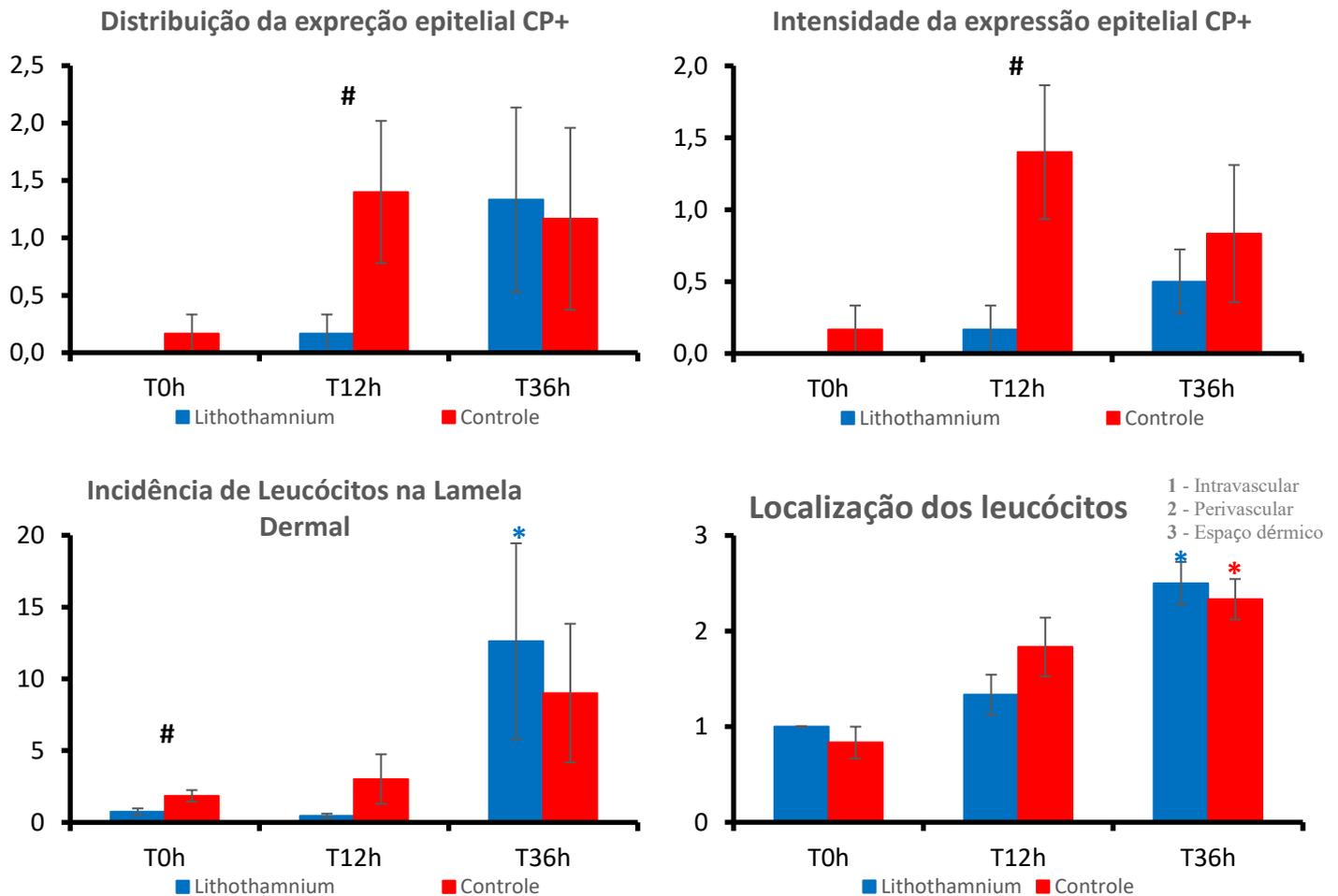
Destaca-se alterações histológicas importantes no CON a partir do T12, como a desconexão da MB da ponta das LES e apenas evidências de arredondamento do núcleo dos queratinócitos no T12 do LITHO e intenso alongamento das LES e enrugamento da MB no T36, lesões significativamente menores que as do CON neste momento. Sendo evidenciado, portanto, efeito protetor do *Lithothamnium muelleri* no casco de equinos com disbiose intestinal induzida.

Na histologia de um casco saudável normalmente é observado as CEBL em formato oval, perpendiculares a MB, assim como os núcleos ovais, centralizados e perpendiculares a MB, observado no momento basal dos animais estudados. Esta estruturação ocorre pela formação do citoesqueleto de uma célula de sustentação com baixo metabolismo mitótico (Pollitt, 2016c). Frente a qualquer alteração metabólica ou física, a sinalização para as células epidérmicas basais se altera para realização de outras funções, novas proteínas devem ser sintetizadas e, para tal, a leitura do DNA é necessária (Faleiros e Belknap, 2017). Nesta etapa, o núcleo antes condensado é descompactado para a leitura do DNA. Portanto, histologicamente o núcleo da CEBL aparece arredondado e claro. Estudos iniciais indicavam que a porcentagem de núcleos de CEBL acima de 50% arredondados, indicavam um início de alteração no ASFD (Faleiros et al, 2011), evidenciados em todos os cavalos do grupo no T12 do CON e somente no T36 do LITHO.

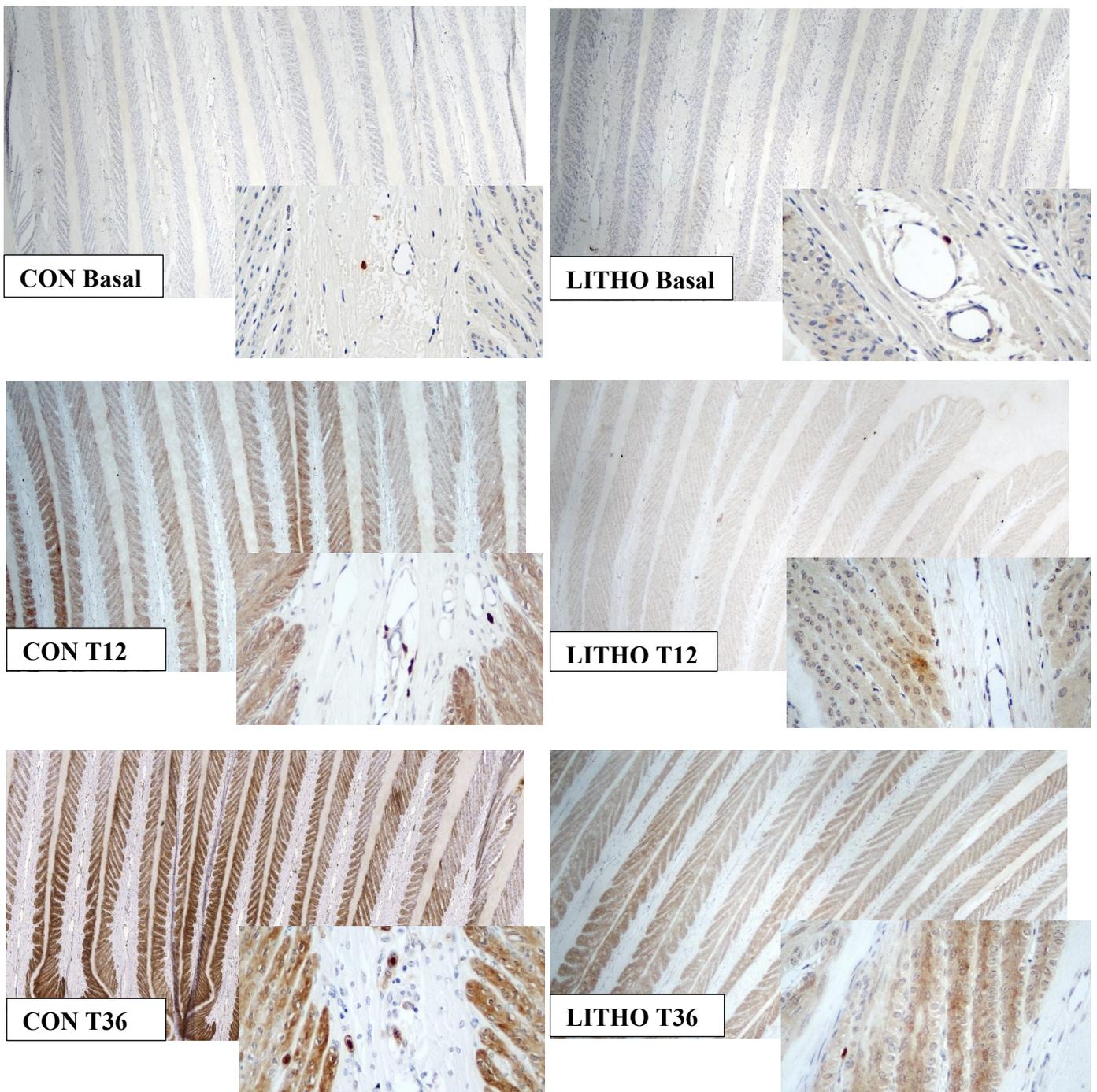
Histologicamente, a MB normalmente delinea a LES e é fortemente aderida às CEBL. As LES são em formato padrão com pontas arredondadas. Com a desestruturação do ASFD as LES se alongam e afinam, alterações evidentes a partir do T12 no CON. Normalmente as LES têm o dobro do comprimento normal e metade da largura. O alongamento, resulta em menos núcleos das células basais por micrômetro de LES. Menor adesão das CEBL a MB é vista inicialmente com a formação de “tetras” na ponta da LES num estágio inicial, identificadas apenas no CON a partir do T12. Com o avançar do dano lamelar, a MB solta formando filamentos extensos de dupla camada a partir da ponta das LES. As CEBL começam a aglutinar em uma massa não estruturada com função suspensora comprometida (Pollitt, 2016c). Lesões caracterizadas em estudo prévio, no qual a histologia lamelar foi realizada 7 dias após a indução de laminite com OF (Van Eps e Pollitt, 2011). Essas mudanças não foram observadas no presente experimento, pois os equinos foram eutanasiados 36 horas após a indução da laminite.

#### 4.12. Imunomarcção de calprotectina

Crescente expressão de calprotectina foi observada nos queratinócitos do CON e LITHO, com diferença entre os grupos na distribuição e intensidade de imunomarcção no T12, mas semelhante infiltrado leucocitário (Figura 24 e 25).



**Figura 24:** Médias  $\pm$  erros padrão da expressão e intensidade de expressão da imunomarcção de calprotectina nas células epidérmicas basais e incidência e localização de leucócitos nas lamelas dérmicas dorsais do casco de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. Em vermelho o grupo controle (CON) e em azul o grupo tratado (LITHO) com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Asterisco indica diferença em relação ao valor basal e hashtags indicam diferença entre grupos. Teste de Normalidade, Kruskal-Wallis test seguidos de Dunn's multiple comparisons test e Mann-Whitney test. # P<0,04; \* P<0,05.



**Figura 25:** Fotomicrografia da seção transversal da parede dorsal das lamelas epidérmicas primárias e secundárias de equinos submetidos a um modelo de indução de laminite relacionada à sepse. CON: grupo controle. LITHO: grupo tratado com *Lithothamnium muelleri* previamente por 7 dias (100mg/kg PO BID). Os tecidos são imunomarcados para calprotectina. Verifica-se ausência de células calprotectina positivas (CP+) nas amostras basais. No **CON T12** é observada presença considerável de CEBL CP+ com moderada intensidade de imunomarcção. No **LITHO T12**, pontual marcação de queratinócitos CP+ é identificado. No **T36** entanto, a distribuição de CEBL CP+ no LITHO se igualou à observada no CON. Aumento das fotomicrografias 10X e 40X.

A ausência de expressão de CP pelas CEBL nas amostras basais da junção lamelar dorsal do casco é consistente com outros estudos com cavalos normais e controles, que mostram pontual ou nenhuma marcação dessa proteína em queratinócitos (Visser, 2008; Faleiros et al., 2009; De Laat et al. 2011 ). No CON a presença considerável de CEBL CP+ com moderada intensidade de imunomarcação foi notada no T12 e persistiu no T36, sem significância estatística. No T12 do LITHO, houve menor incidência de CEBL CP+, com discreta intensidade de imunomarcação, significativamente menores que o CON ( $P=0,0152$ ). No entanto, a distribuição de CEBL CP+ no LITHO se igualou à observada no CON com a mesma intensidade de marcação no T36.

No T0, a quantidade de leucócitos CP+/cm<sup>2</sup> no tecido lamelar do LITHO (0,74 céls CP+/cm<sup>2</sup>) foi significativamente menor ( $P=0,0173$ ) que a contagem no CON (1,85 céls CP+/cm<sup>2</sup>). De modo geral, a imunolocalização foi limitada à ocorrência ocasional de leucócitos, situados dentro de vasos na derme lamelar (De Laat et al. 2011). No T12 a incidência de leucócitos CP+ na lamela dermal continuou baixa sem diferença entre os grupos, como observado por (Faleiros et al., 2011). Contudo no T36, um aumento significativo no LITHO (12,71 céls CP+/cm<sup>2</sup>,  $P<0,05$ ) e considerável no CON (9,0 céls CP+/cm<sup>2</sup>) foi identificado na quantidade de leucócitos CP+ na lamela dermal. Apesar de não haver diferença entre os grupos, cabe ressaltar que no T36 do CON o número de leucócitos CP+ foi 4 vezes maior que a contagem basal, ao passo que no LITHO foi 17 vezes maior. De modo interessante, o *Lithothamnium muelleri* não foi capaz de reduzir a migração de leucócitos, apesar de estudos prévios terem demonstrado o potencial de frações de polissacarídeos da alga em reduzir o rolamento e a adesão ao endotélio vascular em camundongos (Soares et al. 2012; Costa et al., 2015). Uma provável explicação é ocorrência discrepante em um animal do LITHO de 46,30 céls CP+/cm<sup>2</sup> no T36 e consequente aumento intenso da média do grupo tratado.

Adicionalmente, significativo aumento no escore de localização dos leucócitos CP+ foi notado no T36 dos dois grupos ( $P<0,05$ ), indicando migração celular na lamela dermal sem efeito do tratamento. Uma grande discussão da LRS é esclarecer qual a contribuição dos leucócitos, de sua migração e degranulação, e dos queratinócitos ativados para a falha no ASFD. De modo geral, o presente estudo fornece dados que sugerem que para a falha na estrutura das CEBL e desconexão da MB é em certo grau dependente principalmente de mudanças primárias nos queratinócitos. Outro ponto interessante de salientar no CON, é a observação primária da

expressão de calprotectina pelas CEBL no T12 em relação ao aumento do número de leucócitos CP+ apenas no T36.

## 5. CONCLUSÃO

A administração oral prévia de *Lithothamnium muelleri* (100mg/kg BID) foi capaz de amenizar e retardar a resposta inflamatória sistêmica, a disfunção de órgãos e os sinais clínicos e histopatológicos da laminite em equinos submetidos a sobrecarga do oligofrutose, demonstrando o potencial de seu uso como suplemento alimentar em cavalos mantidos em condições alimentares, sanitárias e de trabalho/treinamento de maior risco para a ocorrência de disbiose, SIRS e sepse.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Eventos no TGI que ocorrem nas primeiras 24 horas após a sobrecarga de CHO são responsáveis pelo início e destruição da interface lamelar do casco momentos depois. Portanto, estratégias de prevenção e tratamento devem preceder a claudicação para melhor eficiência (Nourian et al., 2007). A incidência de laminite nos casos de doenças intestinais aumenta com a gravidade do quadro, porém outros fatores interferem, e, cavalos com quadro sistêmico grave podem não desenvolver laminite, ao passo que outros com alterações moderadas pode vir a desenvolver (Eades, 2017). A questão é compreender quais são os fatores que minimizam o risco da SRL.

Um ponto importante de ressaltar, é a necessidade de adequar a dieta dos cavalos, pois uma vez a microbiota não adaptada a alta carga de CHO, um quadro de sepse grave se desenvolve e os equinos evoluem rapidamente a óbito (Van Eps e Pollitt, 2006). Portanto, até fatores nutricionais podem influenciar na susceptibilidade. Outro ponto relevante, é o grau de tolerabilidade do sistema imune à presença de PAMPs na circulação. É sabido, que a resposta imune adaptativa de memória não é promovida por PAMPs de origem bacteriana, e o reconhecimento desses padrões desencadeia uma sinalização inflamatória em massa (Abbas, 2018). Apesar da lesão da mucosa e, conseqüentemente, a exposição direta à patógenos e aos produtos da degradação microbiana ser inevitável nos casos de sobrecarga por CHO, é importante minimizar os efeitos sistêmicos da grave disbiose e destruição da barreira física da mucosa intestinal.

O *Lithothamnium muelleri* no estudo demonstrou potencial efeito de regulação da resposta inflamatória e a capacidade de minimizar os danos sistêmicos e na junção lamelar do casco de cavalos induzidos a laminite com OF. Contudo, mais estudos são necessários para se avaliar os potenciais efeitos do *Lithothamnium* spp. em outros modelos de LRS, ou mesmo em casos de ocorrência natural.

A composição molecular próxima dos PSS aos LPS poderia ser benéfica para se apresentar diariamente ao sistema imune e modular a resposta para a situação de absorção de altos níveis de LPS em processos infecciosos e entéricos, principalmente. Estudos já demonstraram que atletas humanos de maratona apresentam níveis elevados de LPS sanguíneos nos finais das corridas sem apresentarem inflamação sistêmica (Camus et al., 1997; Camus et al., 1998). Acredita-se assim que sua apresentação contínua poderia então, de certa forma, modular o sistema imune de forma a impedir reações exacerbadas ao LPS. Portanto, além dos efeitos já demonstrados de ação antioxidantes e anti-inflamatórias (Frested et al. 2008; 2009; Aslam et al. 2010; Soares et al. 2012; Taddei et al. 2014; Costa et al., 2015), e imunomoduladoras em transplante de células (Rezende et al. 2013) o presente estudo sugere que o uso contínuo de *Lithothamnium* spp. pode regular a resposta do sistema imune do equino em quadros septicêmicos, e minimizar expressivamente as consequências.

## **7. PERSPECTIVAS PARA EXPERIMENTOS FUTUROS**

Em relação a melhorias que podem ser incorporadas na metodologia experimental para novos estudos avaliando equinos submetidos à modelos de laminite relacionada à sepse, acredita-se que um acompanhamento com exames físicos a cada 2-4 horas (Van Eps e Pollitt, 2006; Black et al. 2006) forneceria dados que caracterizariam melhor o quadro séptico induzido pela administração de OF. Adicionalmente, um exame ultrassonográfico em pontos específicos abdominais de delgado, ceco e cólon maior seria interessante para avaliar a motilidade intestinal (Pedroza, 2019). Aferições seriadas da pressão arterial pelo método não invasivo poderiam também auxiliar na melhor caracterização do quadro de descompensação cardiovascular. O uso de termografia para se aferir a temperatura dos cascos e o doopler para identificar mudanças no fluxo sanguíneo digital, pode ser interessante para melhor caracterizar as mudanças no casco (Aguirre et al., 2013).

Quanto aos exames laboratoriais, a aferição do lactato sanguíneo poderia ser um critério valioso para este tipo de estudo, pois revelaria o ponto inicial de falha na perfusão e oxigenação tecidual, e o grau de acidose metabólica dos animais submetidos a sobrecarga por OF (Barton e Peroni, 2018), principalmente, por apresentar boa correlação com a gravidade do quadro e estar associado ao risco de óbito 6 vezes maior quando alterado em cavalos admitidos na emergência (Roy et al., 2017).

A classificação do padrão respiratório e a saturação de O<sub>2</sub> por oximetria digital são avaliações de fácil execução que podem ser empregadas (McConachie et al., 2016; Wilkins et al., 2007). Os níveis de colesterol total, ajudariam na caracterização de mudanças no metabolismo energético, ou mesmo na função hepática. A concentração sérica de amônia também poderia ser incluída no protocolo de monitoração a fim de promover melhor compreensão do quadro de redução significativa de ureia, assim como, a realização de urinálise. Em relação ao monitoramento renal, a dimetilarginina simétrica (SDMA) é um preditor de insuficiência mais confiável que a creatinina, pois se acumula com 25 % de falha renal (Hall et al, 2016).

Outro fator interessante a ser incorporado é uma avaliação específica de sistema nervoso, através da observação, análise e classificação da atitude (McConachie et al., 2016), pois grau leve a moderado de depressão e inapetência foram nos cavalos induzidos a laminite por OF (French e Pollitt, 2004; Van Eps e Pollitt 2006).

Em relação a análise histológica do casco, um espaçamento menor nos tempos das biópsias de casco (Milinovich et al., 2007), pode fornecer uma curva mais completa de evolução da expressão de calprotectina pelas CEBL, do infiltrado leucocitário e, principalmente, das alterações morfológicas lamelares. Adicionalmente, o estudo morfométrico das LEP e LES (De Laat et al., 2011) fornecerá dados mais consistentes quanto às alterações desencadeadas pela disbiose intestinal.

Estudos adicionais para determinar a expressão de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão no tecido lamelar do casco, poderiam fornecer uma melhor compreensão quanto ao provável mecanismo de ação do *Lithothamnium muelleri*.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADEY, W. H.; MCKIBBIN, D. L. Studies on the maerl species *Phy-matolithon calcareum* (Pallas) nov. comb. and *Lithothamnium corallioides* Crouan in the Ria de Vigo. *Botanical Marina*, v. 13, p. 100-106, 1970.
- ANNANE, D.; BELLISSANT, E.; AND CAVAILLON, J. M. Septic shock. *Lancet*, v. 365, p. 63–78, 2005.
- ARROYO, M.G.; SLOVIS, N.M.; MOORE, G.E.; TAYLOR, S.D. Factors associated with survival in 97 horses with septic pleuropneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 31, p. 894-900, 2017.
- ASLAM, M. N.; PARUCHURI, T.; BHAGAVATHULA, N.; VARANI, J. A mineral-rich red algae extract inhibits polyp formation and inflammation in the gastrointestinal tract of mice on a high-fat diet. *Integrative Cancer Therapies*, v. 9, p. 93-99, 2010.
- ASPLIN, K. E.; PATTERSON-KANE, J. C.; SILLENCE, M. N.; POLLITT, C. C.; C M MC GOWAN, C. M. Histopathology of insulin-induced laminitis in ponies. *Equine Veterinary Journal*, v.42, p. 700-706, 2010.
- AGUIRRE, C. N.; TALAVERA, J.; DEL PALACIO, M. J. F. Usefulness of Doppler ultrasonography to assess digital vascular dynamics in horses with systemic inflammatory response syndrome or laminitis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 243, p. 1756-1761, 2013.
- ALEMAN, L.; GUERRERO, J. Sepsis hyperglycemia in the ICU: from the mechanism to the clinic. *Revista Médica de Chile*, v. 146, p. 502-510, 2018.
- Ali, B. H. Dimethyl sulfoxide: recent pharmacological and toxicological research. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 43, p. 228-231, 2001.
- ALMEIDA, F.; SCHIAVO, L. V.; VIEIRA, A. D.; ARAÚJO, G. L.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; TEIXEIRA, M. M.; CASSALI, G. D.; TAGLIATI, C. A. Gastroprotective and toxicological evaluation of the *Lithothamnium calcareum* algae. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 1399-1404, 2012.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology. 9ed. Philadelphia: Elsevier, p. 27-93, 2018.
- BARTON, M. H.; PERONI, J. F. Systemic Inflammatory Response. In: *Equine Surgery*. 5ed. St. Louis: Elsevier, p. 17-22, 2018.
- BAXTER, G.M.; MORRISON, S. Complications of unilateral weight bearing. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. v. 24, p. 621-642, 2008.
- BAILEY, S.R.; ADAIR, H.S.; REINEMEYER, C.R.; MORGAN, S.J.; BROOKS, A.C.; LONGHOFER, S.L.; ELLIOTT, J. Plasma concentrations of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose-induced laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 129, p. 167–173, 2009.
- BELKNAP, J.K., GIGUERE, S., PETTIGREW, A., COCHRAN, A. M.; VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. *Equine Veterinary Journal*, v. 39, p. 42–47, 2007.
- BELKNAP, J.K. Pathogenesis of laminitis. In: *Current Therapy in Equine Medicine*, 6ed. Philadelphia: Saunders, p 541-543, 2008.

- BELKNAP, J.K., MOORE, J.N., AND CROUSER, E.C. Sepsis – From human organ failure to laminar failure. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 129, p. 155–157, 2009.
- BELKNAP, J. K. Laminitis: An Overview. In: *Equine Laminitis*. 1ed. Iowa: Wiley, p. 11-12, 2017.
- BLACK, S.J.; LUNN, D.P.; YIN, C.; HWANG, M.; LENZ, S. D.; BELKNAP, J. K. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 109, p. 161–166, 2006.
- BONE, R.C., BALK, R.A., CERRA, F.B., DELLINGER, R.P., FEIN, A.M., KNAUS, W.A., SCHEIN, R.M., AND SIBBALD, W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, v. 101, p. 1644–1655, 1992.
- BOS, J.D.; LUITEN, R.M. Skin immune system. *Cancer Treatment and Research*, v. 146, p. 45–62, 2009.
- BUDRAS, K.D., HIRSCHBERG, R., HINTERHOFER, C., POLSTERER, E., AND KONIG, H.E. The suspensory apparatus of the coffin bone. Part 1: The fan-shaped re-inforcement of the suspensory apparatus at the tip of the coffin bone in the horse. *Pferdeheilkunde*, v. 25, p. 96–104, 2009a.
- BUDRAS, K.D., HINTERHOFER, C., HIRSCHBERG, R., POLSTERER, E., AND KONIG, H.E. The suspensory apparatus of the coffin bone. Part 2: Clinical relevance of the suspensory apparatus and its fan-shaped reinforcement in chronic equine laminitis with coffin bone or hoof capsule rotation. *Pferdeheilkunde*, v. 25, p. 198–204, 2009b.
- CAIRNS, A. AND LONGLAND, A. Sugar in grasses – an overview of sucrose and fructan accumulation in temperate grasses. *International Research Conference on Equine Laminitis*, Stoneleigh, Warwickshire, UK, p. 1-3, 1998.
- CAMUS, G.; POORTMANS, J.; NYS, M.; DEBY-DUPONT, G.; DUCHATEAU, J.; DEBY, C.; LAMY, M. Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clinical Science*, v. 92, p.415-422, 1997.
- CAMUS, G.; NYS, M.; POORTMANS, J.R.; VENNEMAN, I.; MONFILS, T.; DEBY-DUPONT G.; JUCHMÈS-FERIR, A.; DEBY, C.; LAMY, M.; DUCHATEAU, J. Possible in vivo tolerance of human polymorphonuclear neutrophil to low-grade exercise-induced endotoxaemia. *Mediators Inflammation*, v. 7, p. 413-415, 1998.
- CECCONI, M.; EVANS, L.; LEVY, M.; RHODES, A. Sepsis and septic shock. *The Lancet*, v. 392, p. 75-87, 2018.
- CHAVES, L. S.; NICOLAU, L. A.; SILVA, R. O.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; JANDVENES ROLIM MEDEIROS, J-V. R. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, v. 35, p. 93-100, 2013.
- CLARKE, L. L.; GARNER, H. E.; HATFIELD, D. Plasma volume, electrolyte and endocrine changes during onset of laminitis hypertension in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, p. 1551-1555, 1982.
- CAMPBELL, N. B.; BLIKSLAGER, A. T. The role of cyclooxygenase inhibitors in repair of ischemic-injured jejunal mucosa in the horse. *Equine Veterinary Journal*, v. 32, p. 59–64, 2000.

- COOK, V. L.; MEYER, C. T.; CAMPBELL, N. B.; BLIKSLAGER, A. T. Effect of firocoxib or flunixin meglumine on recovery of ischemic-injured equine jejunum. *American Journal of Veterinary Research*, v. 70, p. 992–1000, 2009.
- COHEN, N.D. Prevalence and factors associated with development of laminitis in horses with duodenitis /proximal jejunitis. 33 cases (1985–1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 204, p. 250–254, 1994.
- COHEN, N.D.; AND WOODS, A.M. Characteristics and risk factors for failure of horses with acute diarrhea to survive: 122 cases (1990–1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 214, p. 382–390, 1999.
- COSTA, V. V.; AMARAL, F. A.; COELHO, F. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MALAGOLI, B. G.; GOMES, J. H. S.; LOPES, F.; SILVEIRA, K. D.; SACHS, D.; FAGUNDES, C. T.; TAVARES, L. D.; PINHO, V.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C.; SOUZA, D. G. *Lithothamnion muelleri* treatment ameliorates inflammatory and hypernociceptive responses in antigen-induced arthritis in mice. *PLoS One*, v. 10, e0118356, 2015.
- COURTOIS, J. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, p. 261-273, 2009.
- COX, S.; VILLARINO, N.; SOMMARDAHL, C.; KVATERNICK, V.; ZARABADIPOUR, C.; SIGER, L.; YARBROUGH, J.; AMICUCCI, A.; REED, K.; BREEDING, D.; DOHERTY, T. Disposition of firocoxib in equine plasma after an oral loading dose and a multiple dose regimen. *The Veterinary Journal*, v. 98, p. 382–385, 2013.
- DALLAP, B. L.; DOLENTE, B.; BOSTON, R. Coagulation profiles in 27 horses with large colon volvulus. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 13, p. 215-225, 2003.
- DABAREINER, R. M.; WHITE, N. A.; SNYDER, J. R.; FELDMAN, B. F.; DONALDSON, L. L. Effects of Carolina rinse solution, dimethyl sulfoxide, and the 21-aminosteroid, U-74389G, on microvascular permeability and morphology of the equine jejunum after low-flow ischemia and reperfusion. *American Journal of Veterinary Research*, v. 66, p. 525-536, 2005.
- DE LAAT, M. A.; MCGOWAN, C. M.; SILLENCE, M. N.; POLLITT, C. C. Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, v. 42, p. 129-135, 2010.
- DE LAAT, M. A.; SILLENCE, M. N.; MCGOWAN, C. M.; POLLITT, C. C. Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinaemia and lamellar histopathology in standardbred horses. *Veterinary Journal*, v. 191, p.317–322, 2012.
- DIBARTOLA, S. P. Introduction to Acid-Base Disorders. In: *Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice*. 2<sup>a</sup> Ed. St. Louis, Elsevier Saunders, p. 246-250, 2012.
- DIVERS, T. J. Common Therapies: Anti-Inflammatory Therapy. In: *Equine Laminitis*. 1ed. Iowa: Wiley, p. 11-12, 2017.
- DRIESSEN, B., BAUQUIER, S.H., AND ZARUCCO, L. Neuropathic pain management in chronic laminitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.*, v.26, p.315–337, 2010.
- EADES, S. C. Sepsis-Related Laminitis. In: *Equine Laminitis*. 1ed. Iowa: Wiley, p. 191-194, 2017.
- FALEIROS, R.R.; NUOVO, G.J.; AND BELKNAP, J.K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, v. 23, p. 174–181, 2009.

- FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.J.; MESSER, N. T.; BLACK, S. J.; BELKNAP, J. K. Lamellar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, v. 25, p. 107–115, 2011.
- FALEIROS, R. R.; BELKNAP, J. K. Leukocytes and Inflammatory Signaling in Laminitis: Leukocytes. In: *Equine Laminitis*. 1ed. Iowa: Wiley, p. 91-99, 2017.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 17, p. 7–55, 2000.
- FLICKINGER, E. A.; VAN LOO, J.; GEORGE C. FAHEY, G. C. Nutritional Responses to the Presence of Inulin and Oligofructose in the Diets of Domesticated Animals: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, p.19–60, 2003.
- FONTAINE, G.L., BELKNAP, J.K., ALLEN, D., MOORE, J. N.; KROLL, D. L. Expression of interleukin-1beta in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 714–720, 2001.
- FRENCH, R; POLLITT, C. C. Equine laminitis: cleavage of laminin 5 associated with basement membrane dysadhesion. *Equine Veterinary Journal*, v. 36, p. 242-247, 2004.
- FRESTEDT, J. L.; WALSH, M.; KUSKOWSKI, M. A.; ZENK, J. L. A natural mineral supplement provides relief from knee osteoarthritis symptoms: a randomized controlled pilot trial. *Nutrition Journal*, v. 7, 9, 2008.
- FRESTEDT, J. L.; KUSKOWSKI, M. A.; JOHN L ZENK, J. L. A natural seaweed derived mineral supplement (Aquamin F) for knee osteoarthritis: A randomised, placebo controlled pilot study. *Nutrition Journal*, v. 8, 7, 2009.
- GABY, A. R. Natural treatments for osteoarthritis. *Alternative Medicine Review*, v. 4, p. 330-341, 1999.
- GALEY, F.D.; WHITELEY, H.E.; GOETZ, T.E.; KUENSTLER, A. R.; DAVIS, C. A.; BEASLEY, V. R. Blackwalnut (*Juglans nigra*) toxicosis: a model for equine laminitis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 104, p. 313-326, 1991.
- GARDNER, A. K.; VAN EPS, A. W.; WATTS, M. R.; Burns, T. A.; Belknap, J. K. A novel model to assess lamellar signaling relevant to preferential weight bearing in the horse. *Veterinary Journal*, v. 221, p. 62–67, 2017.
- GOETZ, T.E. Anatomic, hoof, and shoeing considerations for the treatment of laminitis in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 190, p. 1323–1332, 1987.
- HIRSIGER, S.; SIMMEN, H. P.; WERNER, C. M.; WANNER, G. A.; RITTIRSCH, D. Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators of Inflammation*, v. 2012: 315941, 2012.
- HENROTIN, Y.; KURZ, B.; AIGNER, T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? Osteoarthritis and cartilage / OARS. *Osteoarthritis Research Society*, v. 13, p. 643-654, 2005.
- HOTCHKISS, R.S. AND KARL, I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine*, v. 348, p. 138–150, 2003.
- HUNT, J.M., EDWARDS, G.B., AND CLARKE, K.W. Incidence, diagnosis and treatment of postoperative complications in colic cases. *Equine Veterinary Journal*, v. 18, p. 264–270, 1986.
- HUNT, R.J. A retrospective evaluation of laminitis in horses. *Equine Veterinary Journal*, v. 25, p. 61–64, 1993.
- JACKMAN, B.R., MORE, J.N., BARTON, M.H., MORRIS, D. D. Comparison of the effects of ketoprofen and flunixin meglumine on the *in vitro* response of equine peripheral blood

- monocytes to bacterial endotoxin. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 58, p. 138–143, 1994.
- JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, v. 9, p. 196–223, 2011.
- JOHNSON, P.J.; TYAGI, S.C.; KATWA, L.C.; GANJAM, V. K.; MOORE, L. A.; KREEGER, J. M.; MESSER, N. T. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. *Veterinary Record*, v. 142, p. 392-396, 1998.
- JUNIOR, O. S. Leucoaférese terapêutica na laminite aguda induzida por oligofrutose em equinos. Tese de doutorado apresentada à Escola de Veterinária – UFMG, programa de Ciência Animal, Belo Horizonte, 2017.
- Katz, L. M.; Bailey, S. R. A review of recent advances and current hypotheses on the pathogenesis of acute laminitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 44, p. 752-761, 2012.
- KALCK, K. A.; FRANK, N.; ELLIOTT, S. B.; BOSTON, R. C. Effects of low-dose oligofructose treatment administered via nasogastric intubation on induction of laminitis and associated alterations in glucose and insulin dynamics in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 70, p. 624-32, 2009.
- KELLER, M.D.; POLLITT, C.C.; MARX, U. C. Nuclear magnetic resonance-based metabonomic study of early time point laminitis in an oligofructose-overload model. *Equine Veterinary Journal*, v. 43, p. 737-743, 2011.
- KING, D. E.; MAINOUS, A. G.; GEESEY, M. E.; et al. Dietary magnesium and C-reactive protein levels. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 24, p. 166-171, 2005.
- KONIG, H.E. AND LIEBICH, H.-G. *Veterinary Anatomy of Domestic Animals*. 4Ed. Scattauer, Stuttgart, 2009.
- KRUEGER, A.S.; KINDEN, D.A., GARNER, H.E., et al. Ultrastructural study of the equine cecum during onset of laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 47, p.1804-1812, 1986.
- KLEIN, B. G. *Cunningham's textbook of veterinary physiology*. 5ed. Saunders: Elsevier, 2013.
- KURZ, B.; JOST, B.; SCHUNKE, M. Dietary vitamins and selenium diminish the development of mechanically induced osteoarthritis and increase the expression of antioxidative enzymes in the knee joint of STR/IN mice. *Osteoarthritis Research Society*, v. 10, p. 119-126, 2002.
- KULLMANN, A.; HOLCOMBE, S. J.; HURCOMBE, S. D.; ROESSNER, H. A.; HAUPTMAN, J. G.; GEOR, R. J.; BELKNAP, J. Prophylactic digital cryotherapy is associated with decreased incidence of laminitis in horses diagnosed with colitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 46, p. 554–559, 2014.
- LASKOSKI, L. M., VALADÃO, C.C.A., VASCONCELOS, R.O., FALEIROS, R. R.; FERRUCCI, D.; SILVA, J. A. F.; MACHADO, D. R. S. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and matrix metalloproteinases in laminar tissue from horses subjected to intestinal obstruction and treated with hydrocortisone. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 30, 115, 2010.
- LASKOSKI, L.M.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; VALADÃO, C.A.; DECONTO, I.; GONÇALVES, K.A.; MONTIANI-FERREIRA, F.; BRUM, J.S.; DE BRITO, H.F.; DE SOUSA, R.S. Systemic leukopenia, evaluation of laminar leukocyte infiltration and laminar lesions in horses with naturally occurring colic syndrome. *Research in Veterinary Science*, v. 101, p.15-21, 2015.

LASKOSKI, L.M.; DITTRICH, R.L.; VALADÃO, C.A.; BRUM, J.S.; BRANDÃO, Y.; BRITO, H.F.; DE SOUSA, R.S. Oxidative stress in hoof laminar tissue of horses with lethal gastrointestinal diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 171, p. 66-72, 2016.

LAMBERT, J. L.; FERNANDEZ, N.J.; ROY, M. Association of Presence of Band Cells and Toxic Neutrophils with Systemic Inflammatory Response Syndrome and Outcome in Horses with Acute Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 30, p. 1284–1292, 2016.

LEISE, B. S.; WATTS, M. R.; ROY, S.; YILMAZ, A. S.; ALDER, H.; J K BELKNAP, J. K. Use of laser capture microdissection for the assessment of equine lamellar basal epithelial cell signalling in the early stages of laminitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 47, p.478–488, 2015.

LEISE, B. Leukocytes and Inflammatory Signaling in Laminitis: Inflammatory Signaling. In: *Equine Laminitis*. 1ed. Iowa: Wiley, p. 102-111, 2017.

LIMA, L. R. Avaliação histológica e imunohistoquímica das lâminas do casco de equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2. Tese de doutorado apresentada à Escola de Veterinária – UFMG, programa de Ciência Animal, Belo Horizonte, 2012.

LOHMANN, K. L.; BARTON, M. H. Endotoxemia. In: *Equine Internal Medicine*. 4ed. St Louis: Saunders Elsevier, p. 807–823, 2010.

MATSUI, M. S.; MUIZZUDDIN, N.; SHOSHANA ARAD, S.; MARENUS, K. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 104, p.13–22, 2003.

MANSON, J.; THIEMERMANN, C.; BROHI, K. Trauma alarms as activators of damage-induced inflammation. *British Journal of Surgery*, v. 99, 12–20, 2012.

MEIER, A.; REICHE, D.; DE LAAT, M.; POLLITT, C. C.; WALSH, D.; SILLENCE, M. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor velagliflozin reduces hyperinsulinemia and prevents laminitis in insulin dysregulated ponies. *PLoS One*, v. 13, e0203655, 2018.

MEYER, D.J.; COLES, E. H.; RICH, L.J. *Medicina de Laboratório Veterinária*. São Paulo: Roca, 1995.

MCCONACHIE, E.; GIGUÈRE, S.; BARTON, M. H. Scoring System for Multiple Organ Dysfunction in Adult Horses with Acute Surgical Gastrointestinal Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 30, p. 1276-1283, 2016.

MILINOVICH, G. J.; TROTT, D. J.; BURRELL, P. C.; THOEFNER, M. B.; BLACKALL, L. L.; JASSIM, R. A. M. AL; MORTON, J. M; POLLITT, C. C. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environmental Microbiology*, v. 8, p. 885-898, 2006.

MILINOVICH, G. J.; TROTT, D. J.; BURRELL, P. C.; CROSER, E. L.; JASSIM, R. A. M. AL; MORTON, J. M.; VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environmental Microbiology*, v. 9, p. 2090-2100, 2007.

MILINOVICH, G. J.; BURRELL, P. C.; POLLITT, C. C., KLIEVE, A. V.; BLACKALL, L. L.; OUWERKERK, D.; WOODLAND, E.; DARREN J TROTT, D. J. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *The ISME Journal*, v. 2, p. 1089-1100, 2008.

- MILINOVICH, G. J.; KLIEVE, V.; POLLITT, C. C.; TROTT, D. J. Microbial events in the hindgut during carbohydrate-induced equine laminitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 26, p. 79–94, 2010.
- MINNICK, P. D.; BROWN, C. M.; BRASELTON, W. E.; MEERDINK, G. L.; M R SLANKER, M. R. The induction of equine laminitis with an aqueous extract of the heartwood of black walnut (*Juglans nigra*). *Veterinary and Human Toxicology*, v. 29, p. 230-233, 1987.
- MOORE, J. N.; GARNER, H. E.; COFFMAN, J. R. Haematological changes during development of acute laminitis hypertension. *Equine Veterinary Journal*, v. 13, p. 240-242, 1981.
- MOORE, J. N., HARDEE, M. M., HARDEE, G. E. Modulation of arachidonic acid metabolism in endotoxic horses: comparison of flunixin meglumine, phenylbutazone, and a selective thromboxane synthetase inhibitor. *American Journal of Veterinary Research*, v. 47, p. 110–113, 1986.
- MUNOZ, E.; ARGUELLES, D.; ARESTE, L.; MIGUEL, L. S.; PRADES, M. Retrospective analysis of exploratory laparotomies in 192 Andalusian and 276 horses of other breeds. *Veterinary Record*, v. 162, p. 303–306, 2008.
- NOSCHKA, E.; VANDENPLAS, M. L.; HURLEY, D. J.; MOORE, J. N. Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 129, p. 242–253, 2009.
- NOURIAN, A. R., BALDWIN, G. I., VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24–30 hours after induction with oligofructose. *Equine Veterinary Journal*, v. 39, p. 360-364, 2007.
- NOBLE, G., EDWARDS, S., LIVEVAART, J., *et al.* Pharmacokinetics and safety of single and multiple oral doses of meloxicam in adult horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 26, p. 1192–1201, 2012.
- OBEL, N. Studies on the histopathology of acute laminitis. Uppsala, Sweden: Almqvist and Wiksells Boktryckeri AK, p.95, 1948.
- OLIVEIRA, A. P. L. Células tronco mesenquimais autólogas infundidas por perfusão regional venosa na terapia da laminite crônica em equinos. Tese de doutorado apresentada à Escola de Veterinária – UFMG, programa de Ciência Animal, Belo Horizonte, 2019.
- PAZ, C. F. R. Cinemática de equinos hígidos, com laminite crônica e em simulação de claudicação, portando diferentes órteses para o estajo córneo. Tese de doutorado apresentada à Escola de Veterinária – UFMG, programa de Ciência Animal, Belo Horizonte, 2019.
- PERNER, A.; CECCONI, M.; CRONHJORT, M.; DARMON, M.; JAKOB, S. M.; PETTILÄ, V.; VAN DER HORST, I. C. C. Expert statement for the management of hypovolemia in sepsis. *Intensive Care Medicine*, v. 44, p. 791–798, 2018.
- POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 28, p. 38-46, 1996.
- POLLITT, C. C.; DARADKA, M. Equine laminitis basement membrane pathology: loss of type IV collagen, type VII collagen and laminin immunostaining. *Equine Veterinary Journal*, p. 139-144, 1998.
- POLLITT, C.C. Anatomy and physiology of the inner hoof wall. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 3, p. 3–21, 2004.
- POLLITT, C. C. The hoof capsule. In: *The illustrated horse's foot: A comprehensive guide*. 1Ed. St. Louis, Elsevier, p. 12, 2016a.

- POLLITT, C. C. The suspensory apparatus of the distal phalanx. In: *The illustrated horse's foot: A comprehensive guide*. 1Ed. St. Louis, Elsevier, p. 63, 2016b.
- POLLITT, C. C. Histology. In: *The illustrated horse's foot: A comprehensive guide*. 1Ed. St. Louis, Elsevier, p. 145, 2016c.
- PARKS, A.H. Anatomy and Function of the Equine Digit. In: *Equine Laminitis*. 1ed. Iowa: Wiley, p. 13-21, 2017.
- REBIERE, P. Evaluation of low-molecular-weight heparin for the prevention of equine laminitis after colic surgery. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 19, p. 113–119, 2009.
- REZENDE, B. M.; BERNARDES, P. T. T.; RESENDE, C. B.; ARANTES, R. M. E; SOUZA, D. G.; BRAGA, F. C.; CASTOR, M. G. M.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. *Lithothamnion muelleri* controls inflammatory responses, target organ injury and lethality associated with graft-versus-host disease in mice. *Marine Drugs*, v. 11, p. 2595-2615, 2013.
- RYAN, S.; O'GORMAN, D. M.; NOLAN, Y. M. Evidence that the marine-derived multi-mineral aquamin has anti-inflammatory effects on cortical glial-enriched cultures. *Phytotherapy Research*, v. 25, p. 765–767, 2011.
- ROY, M. F.; KWONG, G.P.S.; LAMBERT, J.; MASSIE, S.; LOCKHART, S. Prognostic value and development of a scoring system in horses with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, v. 31, p. 582-592, 2017.
- SASAKI, S.; IWATA, H.; ISHIGURO, N.; HABUCHI, O.; MIURA, T. Low-selenium diet, bone, and articular cartilage in rats. *Nutrition*, v. 10, p. 538-543, 1994.
- SEMRAD, S.D.; HARDEE, G.E.; HARDEE, M.M.; MOORE, J. M. Low-dose flunixin meglumine: effects on eicosanoid production and clinical signs induced by experimental endotoxaemia in horses *Equine Veterinary Journal*, v. 19, p. 201–206, 1987.
- SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C.S.; SEYMOUR, C.W.; SHANKAR-HARI, M.; ANNANE, D.; BAUER, M.; BELLOMO, R.; BERNARD, G.R.; CHICHE, J.D.; COOPERSMITH, C.M.; HOTCHKISS, R.S.; LEVY, M.M.; MARSHALL, J.C.; MARTIN, G.S.; OPAL, S.M.; RUBENFELD, G.D.; VAN DER POLL, T.; VINCENT, J.L. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *The Journal of the American Medical Association*, v. 23, p. 801-810, 2016.
- SHAKIBAEI, M.; KOCIOK, K.; FORSTER, C.; GÜNTHER, T.; STAHLMANN, R.; H J MERKER, H. J. Comparative evaluation of ultrastructural changes in articular cartilage of ofloxacin-treated and magnesium deficient immature rats. *Toxicologic Pathology*, v. 24, p. 580-587, 1996.
- SLATER, M.R., HOOD, D.M., AND CARTER, G.K. Descriptive epidemiological study of equine laminitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 27, p. 364–367, 1995.
- SOARES, C. M.; MALAGOLI, B. G.; MENEZES, G. B.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C. Antiadhesive activity of polysaccharide-rich fractions from *Lithothamnion muelleri*. *Journal of Biosciences: Zeitschrift für Naturforschung*, v. 67, p. 391–397, 2012.
- SULLINS, K. E.; WHITE, N. A.; LUNDIN, C. S.; DABAREINER, R.; GAULIN, G. Prevention of ischaemia-induced small intestinal adhesions in foals. *Equine Veterinary Journal*, v. 36, p. 370-375, 2004.
- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2ed. Iowa: Blackwell, 2008.

- TIZARD, I. Innate Immunity: The Recognition of Invaders. In: *Veterinary Immunology*. 9ed. St. Louis: Elsevier, 2013a.
- TIZARD, I. Systemic Responses to Inflammation. In: *Veterinary Immunology*. 9ed. St. Louis: Elsevier, 2013b.
- TADDEI, S. R. A.; MADEIRA, M. F. M.; LIMA, I. L. A.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MOURA, A. P.; OLIVEIRA, D. D.; ANDRADE JR, I.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; TARCÍLIA APARECIDA DA SILVA, T. A. Effect of Lithothamnium sp and calcium supplements in strain- and infection-induced bone resorption. *Angle Orthodontist*, v. 84, p. 980-988, 2014.
- TADROS, E. M.; FRANK, N.; NEWKIRK, K. M.; DONNELL, R. L.; HOROHOV, D. W. Effects of a "two-hit" model of organ damage on the systemic inflammatory response and development of laminitis in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 150, p. 90-100, 2012.
- UBERTI, B.; PRESSLER, B.M.; ALKABES, S.B.; CHANG, C-Y.; MOORE, G.E.; LESCUN, T.B.; SOJKA, J.E. Effect of heparin administration on urine protein excretion during the developmental stage of experimentally induced laminitis in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 71, p. 1462-1467, 2010.
- URAYAMA, S.; ARIMA, D.; MIZOBE, F.; SHINZAKI, Y.; NOMURA, M; MINAMIJIMA, Y.; KUSANO, K. Blood glucose is unlikely to be a prognostic biomarker in acute colitis with systemic inflammatory response syndrome in Thoroughbred racehorses. *Journal of Equine Science*, v. 29, p. 15–19, 2018.
- VAN EPS, A.W. AND POLLITT, C.C. Equine laminitis: cryotherapy reduces the severity of the acute lesion. *Equine Vet. J.*, v. 36, p. 255–260, 2004.
- VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Equine laminitis induced with oligofructose. *Equine Veterinary Journal*, v. 38, p. 203-208, 2006.
- VAN EPS, A.W. AND POLLITT, C.C. Equine laminitis model: cryotherapy reduces the severity of lesions evaluated seven days after induction with oligofructose. *Equine Veterinary Journal*, v. 41, p. 741–746, 2009a.
- VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Equine laminitis model: Lamellar histopathology 7 days after induction with oligofructose. *Equine Veterinary Journal*, v. 41, p. 735–740, 2009b.
- VAN EPS, A. W.; LEISE, B. S.; WATTS, M.; POLLITT, C. C.; BELKNAP, J. K. Digital hypothermia inhibits early lamellar inflammatory signalling in the oligofructose laminitis model. *Equine Veterinary Journal*, v. 44, p. 230–237, 2012.
- VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C.; UNDERWOOD, C.; MEDINA-TORRES, C. E.; GOODWIN, W. A.; BELKNAP, J. K. Continuous digital hypothermia initiated after the onset of lameness prevents lamellar failure in the oligofructose laminitis model. *Equine Veterinary Journal*, v. 46, p. 625–630, 2014.
- VAN EPS, A.; POLLITT, C. C. Digital Hypothermia. In: *Equine Laminitis*. 1ed. Iowa: Wiley, p. 309, 2017.
- VAN EPS, A. W.; BURNS, T. A. Are there shared mechanisms in the pathophysiology of different clinical forms of laminitis and what are the implications for prevention and treatment? *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 35, p. 379–398, 2019.
- VAN HOOGLMOED, L. M.; SNYDER, J. R.; HARMON, F. In vitro investigation of the effect of prostaglandins and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on contractile activity of the equine smooth muscle of the dorsal colon, ventral colon and pelvic flexure. *American Journal of Veterinary Research*, v. 61, p. 1259–1266, 2000.

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

WAGNER, I. P.; HEYMERING, H. Historical Perspectives on Laminitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 15, p. 295-309, 1999.

WALSH, D. M; BURNS, T. A. Historical Perspective on Equine Laminitis In: *Equine Laminitis*. 1ed. Iowa: Wiley, p. 11-12, 2017.

WEISS, D.J., EVANSON, O.A., MACLEAY, J.; BROWN, D. R. Transient alteration in intestinal permeability to technetium Tc99m diethylene triamine penta acetate during the prodromal stages of alimentary laminitis in ponies. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, p. 1431-1434, 1998.

YAMAGA, T.; TSUZUKI, N.; SEO JONG, P.; OSHITA,N.; NAKAO, S.; TANABE, T.; SASAKI, N.; INADA, O. Effects of cyclooxygenase-2 inhibitor on equine gastric mucosa. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 65, p. 597, 2012.