

Universidade Federal de Minas Gerais

Odael Spadeto Junior

Leucoaférese terapêutica na laminite aguda induzida por oligofrutose em equinos

Belo Horizonte

2017

Universidade Federal de Minas Gerais

Odael Spadeto Junior

Leucoaférese terapêutica na laminite aguda induzida por oligofrutose em equinos

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

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinária.

Prof. Orientador: Rafael R. Faleiros.

Belo Horizonte

2017

S7321 Spadeto Junior, Odael, 1976-
Leucoafêrese terapêutica na laminite aguda induzida por oligofrutose em equinos /
Odael Spadeto Junior. – 2017.
97 p. : il.

Orientador: Rafael Resende Faleiros

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Equino – Doenças – Teses. 2. Casco de animais – Doenças – Teses. 3. Laminite –
Teses. I. Faleiros, Rafael Resende. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. III. Título.

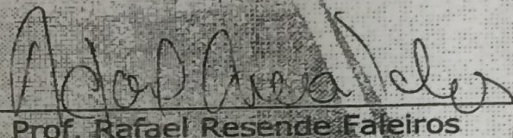
CDD – 636.108 967

FOLHA DE APROVAÇÃO

ODAEI SPADETO JÚNIOR

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

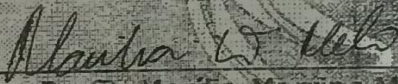
Aprovada em 24 de Março de 2017, pela banca constituída pelos membros:



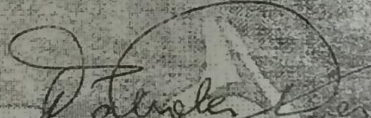
Prof. Rafael Resende Faleiros
Presidente - Orientador




Prof.ª Luciane Maria Laskoski
Universidade Federal do Acre - UFAC



Prof.ª Marília Martins Mala
Escola de Veterinária - UFMG



Prof.ª Fabíola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Leonardo Rodrigues de Lima
Hospital Veterinário Estrada Real - JF



“O dinheiro faz homens ricos, o conhecimento faz homens sábios e a humildade faz grandes homens...”

Mahatma Gandhi.

Dedico essa Tese ao Senhor Todo Poderoso, a meus Pais Odael Spadeto e Maria Belisario Spadeto, ao meu irmão Fábio Magno Spadeto e a minha noiva Thaís Costalonga Correa.

Agradecimentos

Ao todo poderoso Deus, por me permitir chegar até aqui, por ter me dado: saúde, força, a família maravilhosa, a noiva, os poucos, porém, verdadeiros amigos que não me abandonam. Senhor muito obrigado

Aos meus pais Odael Spadeto e Maria Belisario Spadeto, ao meu irmão Fábio Magno Spadeto, pela força e positivismo que sempre me mantiveram de pé e na luta. Sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

A minha noiva e futura esposa Thaís Costalonga Correa (Nega), muito obrigado pelo apoio, pelo carinho, pela paciência e pelo amor e compreensão durante esse período.

Ao Professor e amigo Rafael Resende Faleiros, pelos ensinamentos profissionais e familiares, pela paciência, pelas cobranças, pelo exemplo de homem, pai e pesquisador. Serei eternamente grato a você.

Ao Professor Geraldo Eleno Silveira Alves por acreditar, por sempre contribuir com inúmeros conhecimentos, pelo exemplo e pelas brincadeiras e sorrisos em momentos de muita tensão. Muito Obrigado.

Ao Professor Pierre Barnabé Escodro e sua equipe na Universidade Federal do Alagoas – UFAL, pela receptividade e apoios quando esse projeto ainda se iniciava.

A Professora Betânia Souza Monteiro pelo apoio com a sua verba de pesquisa.

A Professora Marília Martins Melo pelo apoio laboratorial durante o experimento e pelas dicas e incentivo na fase de qualificação.

A Professora Fabíola e Paulo Ricardo pelo apoio laboratorial e todos os seus residentes pelo pronto atendimento durante o experimento.

Ao Coordenador do Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Vila Velha – UVV, Professor Fernando Luiz Tobias pela compreensão e apoio durante esses quatro anos.

Aos Professores Betânia Souza Monteiro, Bárbara Loureiro, Clarisse Simões Coelho, Marcel F. B. Avanza pelas aulas invertidas, trocadas e substituídas. Obrigado.

Ao amigo Alvaro Oliveira de Paula, pela amizade, pelo apoio técnico, logístico, pelas brincadeiras e refeições familiares. Você é o cara, Caratingaman, Randup.

Aos amigos de pós-graduação Cahuê, Sérgio, Rodrigo Ribeiro vocês foram, talvez sem saberem, incentivadores e motivadores nessa extenuante, porém gratificante caminhada. Muito obrigado.

Aos amigos Rodrigo Valadares, Eutálio, Patrícia, Thairê, Letícia, Jerusa pelo apoio e auxílio durante meu experimento. Muito obrigado.

A Terumo BCT do Brasil e sua técnica Andrea Frenk pelo pronto atendimento em ceder o equipamento e nos ajudar ativamente com os procedimentos de leucoaférese. Muito Obrigado.

Ao amigo Osimar pela receptividade em Avaré, SP e pelo pronto atendimento no período em que lá estivemos. Obrigado.

A Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e seu programa de pós-graduação. Serei eternamente grato e orgulhoso por ter sido aluno dessa renomada instituição.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. HIPÓTESE	20
3. OBJETIVO GERAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO 01 – LAMINITE EQUINA: UMA BREVE REVISÃO	21
1. INTRODUÇÃO	21
2. A LAMINITE INFLAMATÓRIA OU RELACIONADA À SEPSE	22
3. LAMINITE ENDOCRINOPÁTICA.....	27
4. OS LEUCÓCITOS E A LAMINITE	28
5. ESTRATÉGIAS PARA REDUZIR DANOS NAS LÂMINAS DÉRMICAS DO CASCO DE EQUINOS COM LAMINITE	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
7. REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2 - NOVA TÉCNICA DE BIÓPSIA DO TECIDO LAMELAR DO CASCO DE EQUINOS.....	36
RESUMO	36
ABSTRACT	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1. TÉCNICA DE BIÓPSIA.....	38
2.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA	40
2.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS	41
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
3. RESULTADOS.....	41
4. DISCUSSÃO.....	44
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 3 - EFEITO DA LEUCOAFÉRESE SOBRE O LEUCOGRAMA DE EQUINOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE SEPSE	48
RESUMO	48
ABSTRACT	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.1. COLETAS DE SANGUE	52

3. RESULTADOS.....	53
4. DISCUSSÃO.....	57
5. CONCLUSÃO	59
6. REFERÊNCIAS	60
CAPITULO 4 – INFLUÊNCIA DA LEUCOAFÉRESE TERAPÊUTICA NOS PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS DE EQUINOS COM LAMINITE E SEPSE INDUZIDA POR MODELO DE OLIGOFRUTOSE.....	63
RESUMO	63
ABSTRACT.....	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.1. INDUÇÃO DA LAMINITE	66
2.2. GRUPO TRATADO – LEUCOAFÉRESE (LEUCO).....	66
2.3 EXAME CLÍNICO E COLETAS DE SANGUE.....	67
3. RESULTADOS.....	68
4. DISCUSSÃO.....	72
5. CONCLUSÃO	77
6. REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 5 - EFEITO DA LEUCOAFÉRESE TERAPÊUTICA NA INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA E LESÃO TECIDUAL NO EXTRATO LAMELAR DO CASCO DE EQUINOS SUBMETIDOS A MODELO DE LAMINITE POR OLIGOFRUTOSE.....	80
RESUMO	80
ABSTRACT.....	81
1. INTRODUÇÃO	82
2. MATERIAIS E MÉTODOS	83
2.1. INDUÇÃO DA LAMINITE	83
2.2. GRUPO TRATADO – LEUCOAFÉRESE (LEUCO).....	84
2.3. BIÓPSIA DOS CASCOS.....	84
2.4. ANÁLISE DE IMAGEM.....	86
3. RESULTADOS.....	87
4. DISCUSSÃO.....	89
5. CONCLUSÃO	94
6. REFERÊNCIAS	95

CAPÍTULO 2 - NOVA TÉCNICA DE BIÓPSIA DO TECIDO LAMELAR DO CASCO DE EQUINOS.....

Tabela 1. Médias e seus desvios padrões com os coeficientes do teste t Student de parâmetros morfométricos obtidos pela projeção radiográfica lateromedial de equinos submetidos à biópsia de casco..... 43

CAPÍTULO 3 - EFEITO DA LEUCOAFÉRESE SOBRE O LEUCOGRAMA DE EQUINOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE SEPSE.....

Tabela 1: Parâmetros avaliados no grupo de equinos Mangalarga Marchador com sepsse induzida por oligofrutose e submetidos ao procedimento de leucoaférese..... 54

Tabela 2: Leucogramas de sangue venoso e de líquido leucocitário obtidos antes (T0), uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas durante e ao final (T4) do procedimento de leucoaférese em equinos Mangalarga Marchador com sepsse induzida por oligofrutose..... 55

CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA LEUCOAFÉRESE NA AVALIAÇÃO CLÍNICA E HEMATOLÓGICA DE EQUINOS SUBMETIDOS AO MODELO DE LAMINITE INDUZIDO POR OLIGOFRUTOSE.....

Tabela 1: Resultado dos animais referentes à claudicação segundo a classificação de Obel e o teste de sensibilidade com a pinça de casco..... 72

CAPÍTULO 5 - EFEITO DA LEUCOAFÉRESE NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LÂMINAS DO CASCO DE EQUINOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE LAMINITE POR OLIGOFRUTOSE.....

Tabela 1. Escores de lesões microscópicas em amostras de tecido lamelar coradas com PAS (Faleiros et al., 2011)..... 85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - NOVA TÉCNICA DE BIÓPSIA DO TECIDO LAMELAR DO CASCO DE EQUINOS.....

Figura 1: Ilustração do Lamelótomo Falcão-Faleiros (INPI-BR 102013018765-8). 39

Figura 2: 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. Observação da ferida cirúrgica (H) e da amostra (I)..... 39

Figura 3. Graus e mediana (traço) de claudicação (lameness) e resposta ao hoof tester em equinos submetidos à biópsia do tecido lamelar do casco..... 42

Figura 4: Fotografia do fragmento da amostra de biópsia submetida à análise histológica. Observe a camada fina de tecido queratinizado no topo seguido por várias lamelas epidérmicas primárias no meio e no fundo derme na parte inferior... 42

Figura 5: Fotografia consecutivas do mesmo cavalo realizadas antes (A) e 1 (B), 30 (C) e 180 (D) dias após biópsia do casco usando o lamelótomo de Falcão-Faleiros. Note que o defeito do casco atingiu a superfície do solo após seis meses sem qualquer tipo de anormalidade proximal..... 44

CAPÍTULO 3 - EFEITO DA LEUCOAFÉRESE SOBRE O LEUCOGRAMA DE EQUINOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE SEPSE.....

Figura 1: Fotografia mostrando procedimento de leucoaférese em um equino (A), o equipamento utilizado para o procedimento (B), uma bolsa de coleta de leucócitos após o procedimento (C e D), e a capa leucocitária na setas vermelhas (C e D)..... 53

CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA LEUCOAFÉRESE NA AVALIAÇÃO CLÍNICA E HEMATOLÓGICA DE EQUINOS SUBMETIDOS AO MODELO DE LAMINITE INDUZIDO POR OLIGOFRUTOSE.....

Figura 1: Médias e erros-padrão da contagem de Frequência Cardíaca (FC), Temperatura retal (T^{ra}), Frequência respiratória (FR) e tempo de preenchimento capilar (TPC) dos equinos com laminite induzida por oligofrutose tratados (Leucoaférese) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo. 68

Figura 2: Médias e erros-padrão da contagem de hemácias (RBC), fibrinogênio (FIB), glicose (GLI) e plaquetas (PLT) dos equinos com laminite induzida por oligofrutose tratados (Leuco) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo..... 69

Figura 3: Médias e erros-padrão do volume globular (VG), da albumina (ALB) das proteínas totais (PTN) e das globulinas (GBL) dos equinos com laminite induzida por oligofrutose tratados (Leucoaférese) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo..... 70

Figura 4: Médias e erros-padrão da contagem de leucócitos, monócitos, segmentados e linfócitos dos equinos com laminite induzida por oligofrutose tratados (Leucoaférese) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo..... 70

Figura 5: Médias e erros-padrão da bilirrubina total (BIL T), da bilirrubina indireta (BIL I), da bilirrubina direta (BIL D) e da aspartato aminotransferase (AST) dos equinos com laminite induzida por oligofrutose tratados (Leucoaférese) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo..... 71

Figura 6: Médias e erros-padrão da contagem de Gama Glutamil Transferase (GGT), Fosfatase Alcalina (FA), Creatinina e Uréia dos equinos com laminite induzida por oligofrutose tratados (Leucoaférese) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo..... 71

CAPÍTULO 5 - EFEITO DA LEUCOAFÉRESE NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LÂMINAS DO CASCO DE EQUINOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE LAMINITE POR OLIGOFRUTOSE.....

Figura 1 – Médias (\pm EP) das contagens de células/leucócitos positivas para calprotectina (A) e graus para lesão histológica/PAS (B) e expressão de calprotectina na epiderme (C) em equinos submetidos a laminite induzida por oligofrutose, tratados (LEUCO) ou não (CON) com leucoaférese..... 88

Figura 2: Fotografia das lâminas dermais de equinos do grupo controle COM e LEUCO em aumento de 20 x e 40 x revelando a presença de leucócitos marcados pela calprotectina (setas pretas) e a diferença da morfologia das lâminas epidermais secundárias (LES) desse grupo com as do grupo submetidos ao protocolo de leucoaférese (LEUCO)..... 89

LISTA DE QUADRO

CAPÍTULO 1 - LAMINITE EQUINA: UMA BREVE REVISÃO.....

Quadro 01: Principais modelos de indução de laminite utilizando a oligofrutose (OF) com respectivos autores, metodologias na indução, sinais clínicos e achados histológicos..... 26

CAPÍTULO 5 - EFEITO DA LEUCOAFÉRESE NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LÂMINAS DO CASCO DE EQUINOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE LAMINITE POR OLIGOFRUTOSE.....

Quadro 1. Escores de lesões microscópicas em amostras de tecido lamelar coradas com PAS (Faleiros et al., 2011a). 85

LISTA DE ABREVIATURAS

AAEP - American Association of Equine Practitioners

AFT – aférese terapêutica

AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais

ALB – albumina

Anim – animais

AST – aspartato aminotransferase

BIL D – bilirrubinas diretas

BIL I – bilirrubinas indiretas

BIL T – bilirrubinas totais

BWE – extrato de noqueira preta

CELS – células

CETEA – Comissão de ética e experimentação animal

CON – grupo controle

CP – Calprotectina

CRE – creatinina

DAMPs – padrões moleculares associados a danos

DMSO – dimetilsulfóxido

DP – Desvio padrão

ENP – extrato de noqueira preta

FA – Fosfatase alcalina

FC – Frequência cardíaca

FIB – fibrinogênio

FR – Frequência respiratória

GBL – globulinas

GLI – glicose

HES – hidroxetilamido

IL – interleucinas

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

LAM - lâminas epidérmicas primárias
LDL - lipoproteínas de baixa densidade
LDP – lâmina dermal primária
LDS – lâmina dermal secundária
LEP – lâmina epidermal primária
LES – lâminas epidermal secundária
LEUCO – grupo tratado por leucoaférese
LMC – leucemia mieloide crônica
LPS – lipolissacarídeos
M0 – momento zero
M1 – momento uma hora
M2 - momento 2 horas
M3 – momento três horas
M4 – momento quatro horas
MMPs – metaloproteinases
MODS – falência múltipla de órgãos
NCI – Instituto Nacional do Câncer
NP – noqueira preta
OF – Oligofrutose
PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos
PLT – plaquetas
RBC – contagem de hemácias
SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SME – síndrome metabólica equina
SOD – superóxido dismutase
TNF – fator de necrose tumoral
URE – ureia
VG – Volume globular
XO – Xantina oxidase

RESUMO

Estudos prévios demonstram que a infiltração leucocitária precede os danos estruturais do tecido lamelar do casco de equinos com laminite. Com a hipótese de que a redução dessa migração, por meio de leucoaférese terapêutica, resultaria em melhora clínica e histológica do tecido lamelar de equinos submetidos à leucoaférese, este estudo teve os seguintes objetivos: 1) validar em equinos o uso do lamelótomo de Falcão-Faleiros, um instrumento especificamente projetado para realizar biópsias do extrato lamelar de animais ungulados; 2) descrever uma técnica de leucoaférese por fluxo contínuo e verificar seus efeitos sobre as contagens de leucócitos sanguíneos; 3) avaliar o efeito da remoção de leucócitos circulantes, por meio de protocolo de leucoaférese, sobre os parâmetros clínicos e hematológicos e identificar a intensidade da infiltração de leucócitos e o grau de dano no tecido laminar do casco de cavalos com laminite aguda induzida por oligofrutose. Para a validação da biópsia utilizaram-se nove equinos adultos submetidos à técnica proposta, que foram monitorados clinicamente e radiograficamente por 60 dias. Para os testes de indução de laminite e a utilização da leucoaférese foram utilizados doze equinos, fêmeas sem histórico prévio de claudicação. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=6), controle (CON) e tratado (LEUCO). Seps e laminite foram induzidas por administração oral de oligofrutose. Os animais foram monitorados de forma clínica e laboratorial. Biópsias seriadas foram realizadas antes e 12, 36 e 72h após indução. Passadas 12 horas após indução os animais do grupo LEUCO foram submetidos a leucoaférese por sistema de coleta por fluxo contínuo com duplo acesso venoso. Sobre a técnica de biópsia, concluiu-se que o lamelótomo de Falcão-Faleiros foi satisfatório, produzindo amostras histológicas em quantidade e qualidade adequadas, sem causar danos irreversíveis aos equinos. Também mostrou-se que o protocolo de leucoaférese reduziu a concentração de leucócitos circulantes e infiltrados no casco, atenuando sinais de inflamação sistêmica e disfunção orgânica, prevenindo óbitos e amenizando lesões lamelares. Concluiu-se que a técnica de biópsia foi eficaz em equinos e que o protocolo terapêutico de leucoaférese se mostrou eficaz experimentalmente, demonstrando potencial para seu uso clínico.

Palavras chaves: cavalos, leucócitos, seps, aférese.

ABSTRACT

Previous studies from our group demonstrated that leukocyte infiltration precedes major structural damage of the lamellar tissue promoted by laminitis in equine hoof. With the hypothesis that the reduction of this migration using therapeutic leukapheresis results in clinical and histological improvement of the lamellar tissue of horses subjected to leukapheresis, this study had the following objectives: 1) to validate in horses the use of Falcão-Faleiros' lamellotome, an instrument specifically designed to perform biopsies of the lamellar tissue of ungulate animals; 2) to describe a continuous flow

leukapheresis technique and to verify its effects on blood leukocyte counts; 3) to evaluate the effect of removal of circulating leukocytes by means of a therapeutic leukapheresis protocol on the clinical and hematological variables and to identify the intensity of leukocyte infiltration and the degree hoof lamellar damage in horses with acute laminitis induced by oligofructose. For the validation of the biopsy, nine adult horses subjected to the proposed technique were used. These horses were monitored clinically and radiographically for 60 days. For the leukapheresis experiments, twelve mares without previous history of lameness were used. Horses were randomly divided into two groups (n=6), control (CON) and treated (LEUCO). Sepsis and laminitis were induced by oral administration of oligofructose. Horses were monitored by clinical and laboratorial assessments. Serial biopsies were performed before and 12, 36 and 72h after induction. Twelve hours after induction the LEUCO animals were subjected to leukapheresis by continuous flow collection system with double venous access. The Falcão-Faleiros lamellotome was fully satisfactory, producing histological samples in adequate quantity and quality, without causing irreversible damage to the horses. It was also shown that the leukapheresis protocol reduced the concentration of circulating and infiltrated lamellar leukocytes, attenuating the signs of systemic inflammation and organic dysfunction, preventing deaths and alleviating lamellar lesions. In conclusion, the biopsy technique was effective in horses and the leukapheresis therapeutic protocol proved to be experimentally effective, demonstrating potential for clinical use.

Key words: horses, leukocytes, sepsis, apheresis.

1. INTRODUÇÃO

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

Laminite é uma enfermidade secundária do dígito do equino que resulta em falência estrutural do mecanismo de aderência do estojo córneo ao esqueleto apendicular, provocando dor e perda da função locomotora. Dessa maneira, essa enfermidade é uma condição comprometedora para a carreira do equino acometido, provocando perdas financeiras significativas à equideocultura, além das implicações sobre o seu bem-estar.

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

Geralmente, a laminite advém de distúrbios gastrintestinais, respiratórios e reprodutivos que deflagram quadro de endotoxemia e resposta inflamatória sistêmica (síndrome da resposta inflamatória sistêmica - SIRS), afetando também animais com alterações endócrinas, como portadores da síndrome de cushing, animais obesos ou que recebam altas dosagens de corticoides.

Laminite aguda ou inflamatória desencadeada por quadros de endotoxemia, sepse e SIRS é mais grave e causa enormes transtornos nos equinos acometidos. A ativação de leucócitos e a migração dessas células para o interstício foram demonstradas nas lâminas dérmicas do dígito e em outros órgãos durante a fase de desenvolvimento da laminite.

Pesquisadores sugerem que a crioterapia causa vasoconstrição periférica profunda e dessa forma é capaz de impedir a chegada, por via hematogena, de células inflamatórias e mediadores capazes de induzir a inflamação no dígito. Assim, essa terapia passou a ser uma das principais para tratamento da laminite aguda e levantou a hipótese de que a inibição da migração dos leucócitos para o tecido laminar é uma tática importante para ser incluída na prática veterinária.

Neste contexto, uma opção na terapêutica da laminite aguda poderia ser a remoção das células inflamatórias presentes na circulação sanguínea na fase inicial do processo de instalação da laminite. Outro fator importante e que se deve ter em consideração é que o tratamento da laminite pode se tornar longo e oneroso e, assim, existe uma necessidade urgente para explorar o potencial de novas estratégias preventivas e terapêuticas para pacientes com ou em alto risco de desenvolver essa afecção. Para isso, uma técnica que poderia ser empregada seria a aférese (leucoaférese), o que minimizaria a chegada desses leucócitos no casco e, conseqüentemente, reduziria o processo de degradação das lâminas dérmicas. Dessa forma, a leucoaférese se tornaria uma opção inovadora na terapêutica da laminite aguda.

A aférese é o procedimento caracterizado pela retirada do sangue total de um doador ou paciente, com separação dos seus componentes por meio de centrifugação ou filtração e devolução do remanescente ao doador ou paciente. De acordo com o componente removido, a aférese pode ser classificada em plasmáférese (remoção de plasma), leucoaférese (remoção leucócitos), eritrocitáférese (remoção de eritrócitos) e plaquetáférese (remoção de plaquetas).

2. HIPÓTESE

A leucoaférese é um procedimento seguro e capaz de remover células inflamatórias na circulação sistêmica e nos cascos de equinos com laminite induzida por oligofrutose, reduzindo assim sintomas sistêmicos e o dano tecidual no tecido lamelar.

3. OBJETIVO GERAL

Testar a leucoaférese como tratamento da laminite séptica induzida em equinos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever a técnica de leucoaférese por fluxo contínuo em equinos, avaliar sua a segurança, viabilidade e verificar sua efetividade como terapia inovadora na medicina de equinos e até na medicina veterinária, além de provocar e ou estimular outras pesquisas com essa técnica.

Avaliar o efeito do sequestro dos leucócitos, por meio de procedimento de leucoaférese automatizada por fluxo contínuo, nos parâmetros clínicos hematológicos de equinos com laminite aguda induzida pelo modelo oligofrutose.

Identificar a intensidade da infiltração de leucócitos e o grau de dano no tecido lamelar do casco de cavalos com laminite aguda induzida por um modelo utilizando a oligofrutose e submetidos à técnica de leucoaférese automatizada.

Verificar em equinos a viabilidade e eficácia do uso de um instrumento cirúrgico denominado lamelótomo Falcão-Faleiros, que foi especificamente desenvolvido para obtenção amostras de tecido lamelar em animais ungulados.

CAPÍTULO 01 – LAMINITE EQUINA: UMA BREVE REVISÃO

1. INTRODUÇÃO

Poucas são as doenças em equinos que promovem respostas emocionais em treinadores, veterinários e ferradores comparadas à laminite. Isso se deve a natureza dessa condição que causa dor e sofrimentos aos animais que são acometidos (Walsh e Burns, 2017). Talvez esse seja um dos motivos pelos quais os pesquisadores têm se dedicado nos últimos anos a fim de tentar decifrar a complexa fisiopatologia relacionada à laminite e consequentemente incluir terapias inovadoras, ainda mais eficazes dos que as já conhecidas.

A laminite equina é definida como inflamação das lâminas dérmicas (LD) do casco e na antiguidade era descrita como doença muitas das vezes intratável e fatal. Por séculos, informações sobre essa doença foram adquiridas a partir de observações do tratamento de casos que ocorreram naturalmente e assim, os avanços no conhecimento da doença eram demasiadamente lentos e rendiam pouca informação conclusiva (Walsh e Burns, 2017). Atualmente a laminite está dividida em três tipos: a inflamatória ou aguda (inter-relacionada a sepse, síndrome da resposta inflamatória sistêmica - SIRS e a falência múltipla de órgãos - MODS); a endocrinopática (relacionada à obesidade e a síndrome metabólica) e a causada pela sobrecarga físico-mecânica de um dos membros (laminite de apoio) (Belknap, 2017).

Com a descoberta e o desenvolvimento de modelos de indução experimentais de laminite, houve um progresso no conhecimento das diferenças fisiopatológicas entre os tipos de laminite. Atualmente a laminite é compreendida como uma doença heterogênea, porém, com o resultado final comum que é a falha estrutural das lâminas digitais (Walsh e Burns, 2017).

Para cada tipo de laminite existem um ou mais modelos experimentais. Tais modelos já estão bem caracterizados com particularidades temporais das respostas celulares e de graus diferentes de lesão orgânicas nas LD. Comumente, para a reprodução da laminite inflamatória, que possui relação com a SIRS, são utilizados os modelos por sobrecarga de carboidratos (amido de milho e oligofrutose - OF) e o extrato de nogueira preta (Black walnut – *Juglans nigra*). Já para a laminite endocrinopática o modelo rotineiramente utilizado é por hiperinsulinemia (Belknap, 2017).

A relação entre a sepse, SIRS, a MODS e a laminite já está bem documentada e nesse contexto os leucócitos se tornaram o foco de diversas pesquisas. Isso se dá devida a descoberta da infiltração de leucócitos (Faleiros et al., 2011b) com aumento na liberação de citocinas inflamatórias (Tadros et al., 2013) quimiocinas e a cicloxigenases no tecido lamelar induzindo migração e adesão leucocitária (Eades, 2010b), estresse oxidativo e apoptose (Laskoski et al., 2016).

Tais alterações são semelhantes aos eventos fisiopatológicos de MODS em humanos (Belknap et al., 2009), o que fortalece a hipótese de que a SIRS antecede o início da claudicação nos equinos sob modelos experimentais, incitando danos lamelares (Faleiros e Belknap, 2017). Nos modelos de laminite inflamatória a febre e a taquicardia antecedem à claudicação o que pode comprovar esse fato (Leise et al., 2011, Lima et al., 2013). Ainda, um estudo retrospectivo mostrou que os cavalos com sinais clínicos compatíveis com SIRS possuíam cinco vezes mais chances de desenvolverem laminite (Eades, 2010b).

Devido à comprovação da relação da sepse, a SIRS com a presença dos leucócitos nas LD do casco, estratégias no tratamento da laminite tem se concentrado para impedir a migração dessas células. Assim, buscou-se uma técnica que conseguisse anular o influxo dos leucócitos para o tecido laminar.

2. A LAMINITE INFLAMATÓRIA OU RELACIONADA À SEPSE

A laminite inflamatória é a mais clássica entre os três tipos (Walsh e Burns, 2017), está associada com endotoxemia em cavalos adultos e, na maioria das vezes, é sequela de estrangulamento gastrointestinal, colite, pleuropneumonia e metrite séptica (Faleiros et al., 2008). Nesses casos a SIRS é uma condição predominante que antecede os danos laminares (Faleiros e Belknap, 2017).

Nas condições ou doenças citadas anteriormente o órgão sede, quando sofre a agressão, na grande maioria das vezes, por patógenos infecciosos liberam e absorvem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são componentes da parede bacteriana (LPS, ácido lipoproteico) ou mitocondriais. A partir do primeiro contato entre PAMPs e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ocorrem estímulos de células inflamatórias, endoteliais e plaquetas, iniciando a resposta inflamatória local. Entretanto, ao atingirem a circulação sistêmica os PAMPs podem estimular respostas por diversas vias e células do hospedeiro de uma única vez, iniciando assim, uma condição de reações exacerbada (SIRS) que se não tratada leva a MODS (Faleiros e Belknap, 2017).

Ao se ligarem aos PAMPs circulantes, os macrófagos liberam citocinas na corrente sanguínea, dentre essas as mais comuns são o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL) 1 e IL 6 (Faleiros e Belknap, 2017). O encontro de PAMPs e citocinas estimula o endotélio vascular a expressar moléculas de adesão e quimiocinas no endotélio vascular de órgãos alvo. Estes eventos endoteliais, combinados com

estimulação de leucócitos circulantes, levam a adesão de leucócitos e subsequente migração para os tecidos distantes do órgão sede onde eles causam lesão tecidual, disfunção e morte celular devido à produção de espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio e proteases (metaloproteinases - MMPs). Alguns pesquisadores acreditam que esse evento acontece concomitantemente nas lâminas digitais, dando início aos danos teciduais locais o que caracterizaria a laminite (Faleiros et al., 2011a, b; Lima, 2012; Faleiros e Belknap, 2017).

Na atualidade, o modelo mais utilizado para a indução da laminite ligada a SIRS, é aquele que utiliza a oligofrutose (OF) (Laskoski et al., 2016; Faleiros e Belknap, 2017). A OF é um frutano comercial de cadeia curta extraído de raízes de chicória (*Cichorium intybus*). A substituição do amido de milho pela OF se deu por que o amido possui capacidade de elevada causar cólicas e taxas altas de mortalidade (Faleiros e Belknap, 2017) (Quadro 01).

Para estudar esse tipo de laminite os pesquisadores utilizam os modelos com carboidratos (Faleiros et al., 2011b) e OF (Van Eps e Pollitt, 2006; Nourian et al., 2007; Van Eps e Pollitt, 2009; Lima et al., 2013; Lima et al., 2016). Em 1975, Garner e colaboradores descreveram um protocolo envolvendo a administração gástrica em *bolus* de uma mistura de amido de milho (85%) e “farinha” de madeira (15%), os cavalos que receberam tal tratamento apresentaram laminite com grau 3 de claudicação segundo Obel entre 32 e 48h febre e endotoxemia. Aproximadamente 20 a 30% dos cavalos da pesquisa não desenvolveram laminite o que foi considerado como limitação do trabalho (Walsh e Burns, 2017).

French e Pollitt, (2004) testaram três diferentes doses de OF em oito equinos divididos em quatro grupos de dois que receberam via oral 7.5 (G1), 10 (G2) e 12.5 g/kg (G3) em *bolus*, sendo que o grupo controle recebeu somente água. Três dias consecutivos antes dos tratamentos, foram administrados 10% das doses. O período experimental durou 48hs e sinais de SIRS e inflamação foram observados, entre eles, diarreia, depressão, inapetência, desidratação, febre e taquicardia. Histologicamente, foi verificado nos animais que receberam a dose de 7,5 g/kg diminuição significativa do número e tamanho de hemidesmossomos (HD). A magnitude da retração e perda de HD aumentou à medida que a dose foi sendo elevada. Em animais que receberam 10 g/kg houve separação esporádica de células basais epidérmicas. A dose 12.5 k/g acarretou extensa separação especialmente na ponta das lâminas epidérmicas secundárias (LES). A presença de leucócitos ocorreu mais intensamente nas lâminas dérmicas dos animais que receberam a dose de 12.5g/kg, porém, também foram encontrados infiltrados inflamatórios nas lâminas dérmicas dos outros equinos com doses inferiores (French e Pollitt, 2004).

Outras pesquisas com a laminite inflamatória utilizando a oligofrutose foram realizadas com a dose de 10 g/kg com pré-sensibilização de 10% da dose três dias antes da indução

(Van Eps e Pollitt, 2006; Van Eps e Pollitt, 2009), assim como outras sem a dose de pré-sensibilização (Nourian et al., 2007; Lima et al. 2013; Lima et al., 2016).

A explicação para esse modelo desencadear a laminite ligada a sepse é pela ação da OF na microbiota intestinal, o que hoje já está bem documentado. Como o equino não produz enzima específica no intestino delgado para sua digestão, a OF chega inalterada ao intestino grosso, onde induz rápido desequilíbrio microbiano caracterizado principalmente por proliferação de bactérias gram-positivas entre ela estreptococos e lactobacilos. A consequência é a produção aumentada de ácido láctico que reduz o pH cecal normal (6,2 - 6,8) para menos de 5, o que acarreta lise de bactérias gram-negativas e lesão do epitélio intestinal (Milinovich et al., 2006; Milinovich et al., 2010).

A principal repercussão da alteração da microbiota cecal caracteriza-se por aumento da permeabilidade da parede e absorção de toxinas bacterianas (PAMPs), através da mucosa danificada. Lipopolissacarídeos - LPS (endotoxinas) resultantes da lise de bactérias gram-negativas associados aos peptidoglicanos, ácido lipoteicóico, aminas vasoativas e exotoxinas liberados devido à rápida proliferação das bactérias gram-positivas seriam os principais PAMPs que são absorvidos pela mucosa do intestino grosso, chegando à corrente sanguínea. Elevações nas concentrações plasmáticas de LPS seguidos picos de TNF- α têm sido descritos respectivamente 8h e 12/24h após a administração da dose de 10g/kg em equinos e isso justificaria os sinais de SIRS (taquicardia, depressão, febre) (Faleiros e Belknap, 2017).

Ainda, o influxo osmótico de água para o lume intestinal associado ao desequilíbrio da microbiota pela alteração do pH, ambos provocados pela chegada abrupta de grandes quantidades de OF ao ceco e cólon, pode explicar o quadro de diarreia intensa, desidratação e apatia que também são sinais clínicos comuns na SIRS em equinos (Van Eps e Pollitt 2006; Milinovich et al., 2010; Lima et al., 2013).

Outro modelo que induz laminite inflamatória é com a utilização do extrato de noqueira preta - NP (Black walnut – *Julgans nigra*). Esse modelo foi descoberto acidentalmente quando os cavalos ingeriam a “serragem” dessa árvore utilizada como cama das cocheiras (Walsh e Burns, 2017). Para a indução da laminite com a NP realiza-se a imersão por cerca de 12h de 1kg de raspas da NP em 5 litros de água, seguindo-se à administração por sonda nasogástrica. (Walsh e Burns, 2017).

Esse modelo se aproxima dos efeitos da administração intravenosa de LPS. Ocorre aumento das citocinas pró-inflamatórias em 3h e ativação de leucócitos, seguidos de febre e leucopenia dentro de 4 h e leucocitose após 12h. Há infiltração de leucócitos lamelares durante a fase de desenvolvimento. Se não houver administração adicional os cavalos tendem a se recuperar totalmente sem sofrerem danos laminares. Entretanto, se houver redosagens, entre 8-12h, podem ser encontradas alterações histológicas como o desarranjo do tecido lamelar basal e destruição de células parabasais, lise e separação da membrana basal (Faleiros e Belknap, 2017).

A hipótese para o mecanismo de ação desse modelo é que os compostos de NP são absorvidos pela mucosa do intestino grosso e quando estão presentes na circulação agem como PAMPS, iniciando toda a cascata inflamatória e a SIRS. Críticos dessa metodologia afirmam que os modelos de indução por NP não imitam com precisão a ocorrência natural da laminite, por induzir resposta inflamatória transitória ao contrário da OF que induz resposta inflamatória progressiva. Mesmo assim, esse modelo permitiu avanços no entendimento da fisiopatologia da doença relacionada a SIRS, incluído a inflamação lamelar com a presença de infiltração de leucócitos (Faleiros e Belknap, 2017).

Quadro 01: Principais modelos de indução de laminite utilizando a oligofrutose (OF) com respectivos autores, metodologias na indução, sinais clínicos e achados histológicos.

Referências	Metodologia	Temporização de sinais clínicos	Achados histológicos
FRENCH, K. R., POLLITT C. C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. Equine vet. J. v. 36, n. 3, p. 230-235, 2004.	08 equinos: 02 por grupo; G1 7.5 g/kg, G2 10 g/kg, G3 12.5 g/kg bolus VO. 10% da dose três dias antes ao bolus VO. Duração de 48 hs.	Diarreia líquida, abundante, às 12-16 hs, interrompida em 36-44 hs, leve a moderada depressão e inapetência em 12-16 hs que persistiu até 28-36 hs. Apetite e comportamento evoluíram/melhoraram após este período e se normalizaram às 48 h. Um cavalo 7,5 g/kg de OF e moderadamente desidratado às 24 h, respondeu a 5 litros de solução poliônica IV. Todos, com exceção de um (7,5 g/kg) receberam flunixin meglumina às 32 hs para aliviar febre leve, taquicardia, depressão e cólica leve transitória.	A dose de 7,5 g/kg diminuiu significativamente tanto o tamanho quanto o número de HD. A magnitude da retração e da perda de HD aumentou à medida que a dose aumentou. A dose de 10 g/kg induziu a separação esporádica de células basais epidérmicas. A dose 12.5 k/g foi associada com uma extensa separação de lâmina densa, especialmente na ponta LES. Presença de leucócitos. Dose de 7,5 g/kg graus 0-1, 10g/kg graus 1-2, 12.5 grau 2-3 de lesão Pollitt (1996).
VAN EPS, A. W.; POLLITT C. C. Equine laminitis induced with oligofructose. Equine vet. J. v.38, n. 3, p. 203-208, 2006.	18 equinos: um piloto com 6 divididos em três grupos com três cada por grupo; G1 7.5 g/kg, G2 10 g/kg, G3 12.5 g/kg bolus VO. Doze equinos divididos em dois grupos de 6 cada GC2 e 10 g/kg	Diarreia líquida, abundante, às 12-16 hs, interrompida em 36-44 hs, leve a moderada depressão e inapetência em 12-16 hs que persistiu até 28-36 hs. Apetite e comportamento evoluíram/melhoraram após este período e se normalizaram às 48 h.	Presença de leucócitos. Dose de 7,5 g/kg graus 0-1, 10g/kg graus 2-3, 12.5 grau 2-3 de lesão Pollitt (1996). Alterações na morfologia laminar alta correlação elevadas com a claudicação.

	CT 10g/kg. Com exceção dos animais controle todos receberam 10% da dose três dias antes ao bolus VO. Duração de 48 hs.	Um cavalo 7,5 g / kg de OF e moderadamente desidratado às 24 h, respondeu a 5 litros de solução poliônica IV. Todos, com exceção de um (7,5 g/kg) receberam flunixinina meglumina às 32 hs para aliviar febre leve, taquicardia, depressão e cólica leve transitória. Pulso nas artérias digitais 24-36 hs.	
NOURIAN, A. R. et al. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24–30 hours after induction with oligofructose. Equine vet. J. v. 39, n.4, p. 360-364, 2007.	08 equinos; 10g/kg VO diluídos em 4 litros de água destilada. Única dose.	12 a 16 hs diarreia e apatia em todos os equinos, 03 equinos eutanasiados em 24 hs e 01 em 30 hs.	Núcleos ligeiramente arredondados e LES pouco pontiaguda. Lesão de membrana basal em poucas LES. Ondulações excessivas na membrana basal.
VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Equine laminitis model: lamellar histopathology seven days after induction with oligofructose. Equine vet. J. v. 41, n.8, p. 735-740, 2009.	06 animais; 10% do bolus três dias antes a indução. Bolus de indução 10g/kg VO.	Claudicação característica de laminite 36 horas após bolus. De 36 a 72 quatro equinos evoluíram de Obel II para III e dois permaneceram no Obel II. Nas 72 hs todos estavam Obel II. Alterações radiográficas pequenas após 72 hs. Duração 07 dias.	Assimetria e alongamento com alguns pontos encurtamento das LES, retração da LEP/eixo queratinizado com desconexão entre LES e LEP (ilhas), figuras de leucócitos (H&E, PAS). MB aderida a LES quando essa estava conectada a LEP, figuras de apoptose. Perda da capacidade de sustentação do esqueleto e casco.
LIMA, L. R. et al. Histologic and inflammatory lamellar changes in horses with oligofructose-induced laminitis treated with a CXCR1/2 antagonist. Pesq. Vet. Bras. v. 36, n. 1, p. 13-18, 2016.	Doze cavalos, administração de 10g/kg VO OF bolus. Animais divididos em dois grupos: tratado (30mg/kg de DF1681B intravenosa, 6, 12, 18 e 24h após a OF) e não tratado, (recebeu placebo). Não houve doses de pré-sensibilização.	Pulso digital 18 e 24 hs e permaneceu até o fim do experimento. Diarreia início às 12 horas e terminando às 48 horas. Congestão de mucosa entre 24 e 48 horas. A maioria dos animais apresentou motilidade intestinal normal durante todo o experimento com um aumento coincidindo com o período de diarreia. Dois animais hipomotilidade entre 36 e	Média de marcação de CP em de 2 e 3 no T36.

		48 horas. Metade dos animais permaneceu por longos períodos em decúbito e foram anoréxicos durante o período de diarreia.	
--	--	---	--

VO. Via oral; g/kg, grama por kilo, OF, oligofrutose; CP, calprotectina; LES, lâminas epidérmicas secundárias; LEP, lâminas epidermais primárias; HD, Hemidesmossomos; T36, tempo 36.

3. LAMINITE ENDOCRINOPÁTICA

Laminite endocrinopática tem sido associada à síndrome metabólica (SME), a resistência à insulina (RI), a síndrome de Cushing (disfunção da *pars* intermédia da glândula pituitária - DPIP) ou a iatrogenia pela administração de corticoides exógenos. É a forma de laminite mais frequente nos países da Europa e América do Norte (70 – 90% de todos os casos). Por outro lado, na medida em que se tem conhecimento dos fatores de risco e capacidade de diagnosticar essas condições endocrinológicas, menor será a incidência e a intensidade desse tipo de laminite (McGowan, 2008; Frank, 2011).

A SME não é uma doença específica, mas sim uma síndrome clínica associada com a laminite endocrinopática. O aumento da adiposidade, hiperinsulinemia e RI são os três componentes principais desta síndrome, sendo difícil separar esses fatores. A hiperinsulinemia é diagnosticada na maioria dos cavalos com RI e os animais afetados são geralmente obesos ou apresentam adiposidade regional (Frank, 2011).

Está ficando cada vez mais claro que a homeostase relacionada a glicose e insulina é um fator crítico para esse tipo de laminite (Walsh e Burns, 2017). Pesquisas revelam que existem três teorias principais inerentes ao mecanismo da laminite endocrinopática, todas elas associadas aos efeitos da resistência à insulina: (1) comprometimento da absorção de glicose; (2) efeitos vasculares; (3) efeitos pró-inflamatórios. Os dois últimos podem estar ligados, uma vez que o endotélio vascular é tipicamente um tecido alvo para os efeitos pró-inflamatório da resistência à insulina (Frank, 2011).

A hiperglicemia é o sinal clássico da RI, isso se deve por conta dos efeitos da insulina na estimulação da dispersão da glicose nos tecidos através de proteínas de transporte denominadas GLUT 4, isso ocorre particularmente no tecido muscular e adiposo. O problema subjacente da resistência à insulina é então a potencial privação de glicose dos tecidos, o que causa morte celular ou danos (McGowan, 2008; Frank, 2011).

McGowan, (2008) e Frank, (2011) descreveram que o tecido do casco saudável possui demanda elevada de glicose, de tal forma que quando amostras do casco são incubadas na ausência dessa molécula, ou na presença de um inibidor de captação dela, as lâminas epidérmicas secundárias separam rapidamente da membrana basal, da mesma forma como ocorre durante a laminite. Adicionalmente, sabe-se que o casco usa glicose a uma

taxa muito rápida em comparação com a maioria de outros tecidos. Assim, qualquer diminuição na taxa de captação de glicose pode ser prejudicial (Frank, 2011; Walsh e Burns, 2017).

Entretanto, já foi comprovado que as lâminas dérmicas são independentes de insulina com base em um número de experiências que indicaram que a captação de glicose no casco não é dependente da insulina nem é influenciada pela sua presença. Talvez isso seja devido ao fato de que as proteínas de transporte de glicose nos ceratinócitos, na sua grande maioria são GLUT 1 que não são dependentes de insulina (McGowan, 2008; McGwan et al., 2010).

É possível que o desarranjo entre glicose e insulina possa estar relacionado às alterações pró-inflamatórias e efeitos sobre os capilares em pacientes portadores de RI. A disfunção vascular manifesta-se como vasoconstrição e atividade pró-coagulante que, cronicamente, envolve remodelamento vascular. A RI e a obesidade em humanos resultam em estado pró-inflamatório, com aumento da produção de citocinas e substâncias semelhantes à citocinas (leptina, resistina), comprometimento na produção de óxido nítrico (NO) e culminando com disfunção endotelial (McGowan, 2008; McGwan et al., 2010)

A disfunção vascular em humanos diabéticos ocorre pelo acúmulo da glicose em células endoteliais (glicotoxicidade). A glicotoxicidade promove a formação de produtos de glicação, reduzindo ainda mais a produção de NO, o que leva a uma indução de espécies reativas de oxigênio e promove a expressão endotelial de mediadores inflamatórios. A insulina também tem efeitos sobre o fluxo de sangue nos pequenos e grandes vasos e, os resultados da RI em ambos é o dano capilar e vasoconstrição em modelos animais e em seres humanos. Embora os efeitos pró-inflamatórios e vasculares da RI possam ser difíceis de separar é claro que um ou ambos predispõem a laminite ao afetar o fluxo sanguíneo ou pela indução de um estado pró-inflamatório, ativação enzimática e consequente dano laminar (McGowan, 2008; McGwan et al., 2010).

Para a indução desse tipo de laminite são utilizados modelos com a manutenção de níveis elevados de insulina e normais de glicose (clamps hiperinsulinêmicos euglicêmicos) em pôneis (Asplin et al., 2007) e equinos (McGwan et al., 2010) durante períodos prolongados de tempo (48 até 72h). As críticas sobre esse modelo são os níveis suprabasais de insulina, o que não é encontrado na prática. Ainda, por estar ligada a obesidade e a pastos ricos em carboidratos, talvez, modelos que utilizem o ganho de peso com dietas ricas nesse componente possa induzir de maneira mais fidedigna este tipo de laminite.

4. OS LEUCÓCITOS E A LAMINITE

Testes com as novas técnicas de biologia molecular para a detecção da presença de sinalizadores inflamatórios (Interleucinas 1- IL1 entre outros) e de marcação

imunohistoquímicas de proteínas (calprotectina entre outros) foram praticamente um marco nos estudos da laminite, pois não havia testes que os identificavam, como também as técnicas convencionais de histologia com a H&E bem com o PAS não marcavam os leucócitos presentes nas lâminas dérmicas (LD) de cavalos com laminite aguda (Faleiros e Belknap, 2017; Walsh e Burns, 2017).

Após a identificação da presença de IL1 nas LDs do casco novas pesquisas para a identificação precoce de leucócitos foram realizadas. Associado a isso, os modelos de indução de laminite permitiram um maior detalhamento no tempo de migração dessas células, o que resultou em pesquisas consistentes que revelam que os leucócitos estão associados diretamente no dano laminar e, após sua chegada a esse tecido, os animais começam a mostrar sinais de claudicação. Dessa forma, os leucócitos ganharam um papel de “protagonista” no estudo da laminite relacionada a SIRS (Faleiros e Belknap, 2017).

Os leucócitos foram identificados em todos os modelos de laminite, tanto nos de caráter inflamatório (OF e NP) como também no relacionado à endocrinopatias (Faleiros e Belknap, 2017). Faleiros et al. (2009a) correlacionaram a leucopenia nos modelos com NP e a chegada das células inflamatórias no casco em aproximadamente 4 h após a indução da laminite. No modelo de OF a migração para as LDs também está relacionada com leucopenia, porém em períodos de tempos maiores (16 a 18 h) que os encontrados no modelo com NP (Lima et al., 2013).

Interessantemente, existem ainda outras correlações importantes como a claudicação. A neutrofilia só ocorreu no modelo de NP após o surgimento da claudicação grau 3 de Obel, sugerindo que os leucócitos migrados para outros órgãos, estavam também causando lesões no casco. Isso embasa a hipótese de que a migração de leucócitos em equinos para órgãos e o casco seria semelhante ao modelo de SIRS em humanos (Belknap, 2009; Faleiros et al., 2009 a). Também foi bem documentado que o infiltrado nas LD é condizente com a leucopenia, o início da claudicação e a marcação de calprotectina das lâminas epidermais o que também indica estresse dessas células no modelo de NP com desarranjo da estrutura lamelar (Faleiros e Belknap, 2017).

Quando se compara os modelos de NP e OF, esse último possui as alterações mais tardias na dinâmica dos leucócitos (10 a 20 hs) e isso também é condizente com a migração dessas células para os tecidos lamelares (Faleiros et al., 2009; Lima et al., 2013; Lima et al., 2016). O início da claudicação também se dá após a detecção da presença de leucócitos na LD, porém, a contagem no modelo de OF é muito superior a encontrada no modelo com a NP. A marcação de calprotectina também se comporta semelhantemente a migração de células inflamatórias (Faleiros e Belknap, 2017).

A febre coincide com o início da migração dos leucócitos que também coincide com a claudicação e a marcação mais intensa da calprotectina nas células epidermais. A medida que os leucócitos se infiltram nas lamelas secundárias aumenta o grau de

claudicação segundo a classificação em grau de Obel (1948) seguida da deterioração das estruturas lamelares (Faleiros e Belknap, 2017).

Comumente a laminite endocrinopática revela sinais clínicos menos intensos que a laminite relaciona a SIRS (McGowan, 2008; McGwan et al., 2010; Frank 2011). No modelo de indução de laminite com o *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico houve detecção da presença de leucócitos esporádico nos sítios de lesão da membrana basal (MB) no momento em que os animais apresentavam claudicação grau 2 de Obel (McGwan et al., 2010; Faleiros e Belknap, 2017). Ao contrário do que foram encontrados em modelos inflamatórios, os leucócitos estiveram em maior número nos membros pélvicos (Faleiros e Belknap, 2017).

Curiosamente há um aumento na contagem de leucócitos em LDs de cavalo obesos com níveis elevados e de insulina, porém, sem desarranjo estrutural e claudicação. De uma maneira geral, as presenças dos leucócitos nas LDs são menos intensas do que nos modelos de laminite inflamatória (McGwan et al., 2010; Faleiros e Belknap, 2017).

5. ESTRATÉGIAS PARA REDUZIR DANOS NAS LÂMINAS DÉRMICAS DO CASCO DE EQUINOS COM LAMINITE

Comprovadamente, até o momento só se conhece a crioterapia como recurso para impedir danos e ou a migração de leucócitos para as LDs de equinos em fase de desenvolvimento da laminite. O hipometabolismo causado pela crioterapia é um dos mecanismos de efeito a ser considerado pelo qual o frio limita a dinâmica progressiva de uma lesão. A taxa metabólica do tecido e o consumo de oxigênio são inversamente relacionados com a temperatura. A exigência reduzida de tecido refrigerado para a glicose, oxigênio e outros metabolitos aumentam a sobrevivência das células durante o período de isquemia (Van Eps et al., 2012; Van Eps et al., 2013).

O intenso efeito do hipometabolismo e a capacidade anti-inflamatória da hipotermia podem proteger o tecido lamelar, durante a fase de desenvolvimento. A crioterapia reduziu significativamente a regulação positiva da matriz de metaloproteinase 2 e RNAm e parece que também é capaz de reduzir a expressão das ILs durante o desenvolvimento da laminite induzida experimentalmente (Belknap, 2010).

Estudos com laminite aguda induzida pela administração de OF mostraram que a hipotermia digital reduziu à gravidade da lesão lamelar e a falha estrutural lamelar, impedido a separação completa dermoepidermal quando se inicia a claudicação (Van Eps et al., 2013). Isso provavelmente aconteceu devido à redução dos eventos inflamatórios lamelares importantes na lesão lamelar, incluindo a expressão das quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, a COX-2 e moléculas de adesão endoteliais (Van Eps et al., 2012). Vasoconstrição intensa também pode impedir a transferência

hematógena dos fatores desencadeantes da laminite incluindo os leucócitos (Belknap, 2010).

Dessa forma, táticas que impedem a chegada desses mediadores inflamatórios ou a migração de leucócitos para o casco de equinos constituem uma opção promissora na terapêutica da laminite. Pensando nisso, Lima et al. (2013), em pesquisa que induziu laminite experimental através da administração oral de OF em equinos, testaram o fármaco reparixina que é capaz de inibir a migração de neutrófilos em processos inflamatórios agudos. Nesse estudo ficou evidenciado que o uso do fármaco minimizou os sinais clínicos e os danos teciduais nas lâminas dérmicas nos dígitos dos animais tratados quando comparados ao grupo controle.

Em outro estudo realizado por Lima et al. (2016) também utilizando a reparixina, houve redução na expressão de IL1 β e IL6, na inflamação e conseqüente redução na deterioração das lâminas dermais do casco de cavalos submetidos ao modelo de indução por OF.

Neste contexto, uma opção na terapêutica da laminite aguda poderia ser a remoção das células inflamatórias presentes na circulação sanguínea na fase de desenvolvimento. Outro fator importante e que se deve ter em consideração é que o tratamento da laminite pode se tornar longo e oneroso. Por isso, existe uma necessidade urgente para explorar o potencial de novas estratégias preventivas e terapêuticas para pacientes com ou em alto risco de desenvolver essa afecção. Para isso, uma técnica que poderia ser empregada seria a aférese (leucoaférese), o que minimizaria a chegada desses leucócitos no casco e, conseqüentemente, reduziria o processo de degradação das lâminas dérmicas. Dessa forma, a leucoaférese se tornaria uma opção inovadora na terapêutica da laminite aguda.

A aférese é o procedimento caracterizado pela retirada do sangue total de um doador ou paciente, com separação dos seus componentes por meio de centrifugação ou filtração e devolução do remanescente ao doador ou paciente. De acordo com o componente removido pode ser classificada em plasmáférese (plasma), leucoaférese (leucócitos), eritrocitáférese (eritrócitos) e plaquetáférese (plaquetas) (Pinto, 2013).

Em equinos, foi realizada a aférese (plasmáférese) experimentalmente para produção de soro hiperimune em 1969 na Índia e logo ocorreu a padronização da técnica (Feige et al., 2003; Feige et al., 2005; Escodro et al., 2012). No Brasil, Bernardo et al. (2012) relataram o primeiro caso de plasmáférese automatizada em equinos, concluindo ser essa uma técnica de fácil execução e segura para os animais que foram submetidos a esse procedimento.

Na Medicina, além da produção de plasmas e soros hiperimunes, tanto a plasmáférese quanto a leucoaférese também são indicadas como recursos de tratamentos de diversas doenças do sistema imunológico, como a psoríase (Ikeda et al., 2013), do sistema hematopoiético, como a síndrome de hiper-viscosidade (Amâncio et al., 2008), do

sistema musculoesquelético, como a polimiosite e a dermatomiosite (Miller et al., 1992), além dos sistemas nervoso e urinário (Pinto, 2013).

Outras pesquisas em humanos já confirmam que a leucoaférese é um procedimento útil no tratamento da SIRS. Kumagai et al. (2010) descreveram bons resultados no índice de sobrevivência de pacientes humanos com quadros de choque séptico que foram submetidos a um modelo de aférese que produziu sequestro de leucócitos ativados, reduzindo os neutrófilos em 78%, os monócitos em 70% e os linfócitos em 10%. Esses autores concluíram que esse procedimento melhora os efeitos deletérios teciduais da SIRS.

Já, na Medicina Veterinária poucos são os relatos da utilização da leucoaférese, porém, Zhi-Gao et al. (2012), utilizando modelo *in vivo* de endotoxemia induzida em cães, conseguiram atenuar as injúrias em órgãos distantes causadas pela resposta inflamatória sistêmica com a técnica de leucoaférese.

Em um estudo com sepse em camundongos (Hagiwara et al. 2011), induzida com a administração de LPS e tratamento por dois diferentes modelos de filtração de leucócitos seis horas após a indução, os autores reduziram a contagem de leucócitos em até 90%. Tais pesquisadores conseguiram uma taxa de sobrevivência de 53% no grupo com filtração baixa e de 80% com alta taxa de filtração de leucócitos. Quando comparado os dois grupos tratados com controle, lesões em pulmão e fígado foram menores nos animais tratados. Os autores justificaram esse achado pela redução da contagem de leucócitos totais e redução dos mediadores inflamatórios circulantes (Hagiwara et al., 2011). Esse trabalho, o descrito por Zhi-Gao et al. (2012) e o realizado por Kumagai et al. (2010) permitem aventar a hipótese de que a leucoaférese constitui um recurso terapêutico de potencial positivo em equinos com laminite na fase de desenvolvimento.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização dos tipos de laminite já está bem definida e os avanços quanto a sua fisiologia foram substanciais após a descoberta dos modelos de indução inflamatória e endocrinopática. Estratégias terapêuticas devem ser dirigidas a inibir a migração dos leucócitos visto que eles possuem grande importância na lesão dermal.

7. REFERÊNCIAS

- AMÂNCIO, J.; SCURO, G. GAZONI, F. M. et al. Leucemia mielóide crônica e síndrome de hiper-viscosidade. Relato de Caso. *Rev. Bras. Terap. Intens.*, v. 20, n. 1, p. 99 – 102, 2008.
- ASPLIN, K. E.; SILLENCE, M. N.; POLLITT, C. C. et al. Induction of laminitis by hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *Vet. J*, v. 174, p. 530- 535, 2007.
- BELKNAP, J. K.; MOORE, J. N.; CROUSER; E. C. Sepsis - from human organ failure to lamellar failure. *Vet. Immunol. Immunopatho.* v.129, p. 155 – 157, 2009.
- BELKNAP, J. K., The pharmacologic basis for the treatment of developmental and acute laminitis. *Vet. Clin. Equine.*, v.26, p.115-124, 2010.
- BELKNAP, J. K. Laminitis: an overview. In: James K Belknap. (Org.). *Equine Laminitis*. 1ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2017, p. 152-158.
- BERNARDO, O. J.; ESCODRO, P. B.; ROVERI, E. G. et al. Automated plasmapheresis in horses: report of two cases. *A. R. S. Veterin.*, v. 28, n.3, 2012
- EADES, S. C. Overview of what we know about the pathophysiology of laminitis. *Journ. Equine Vet. Science.* v. 30, n. 2. p. 83 – 86, 2010. (b).
- ESCODRO, P. B.; BERNARDO, O. J.; ESCODRO, L. O. et al. Plasmaférese automatizada em equino: relato de procedimento. *R. Bras. Cienc. Vet.*, v. 19, n. 2, p. 74-77, 2012.
- FALEIROS, R. R.; JOHNSON, P. J.; NUOVO G. J., et al. Lamellar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *J. Vet. Internal Medicine.*, v.25, p.107-115, 2011b.
- FALEIROS, R. R.; BELKNAP, J. K. Leukocytes and Inflammatory signaling in laminitis. In: James K Belknap. (Org.). *Equine Laminitis*. 1ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2017, v. p. 401-436.
- FEIGER, K.; EHRAT, F. B.; KASTNES, S. B. R. et al. Automated plasmapheresis compared with other plasma collection methods in horse. *Journ. Vet. Med.*, v. 50, p. 185-189, 2003.
- FEIGER, K.; EHRAT, F. B.; KASTNES, C. C.; WAMPFLER, B. The effects of automated plasmapheresis on clinical, haematological, biochemical and coagulation variables in horses. *Vet. J*. v.169, p. 102 – 107, 2005.

- FRANK, N. Equine metabolic syndrome. *Vet. Clin. Equine.*, v. 27, p 73-92, 2011.
- FRENCH, K. R., POLLITT C. C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. *Equine Vet. J.*, v. 36, n. 3, p. 230-235, 2004.
- HAGIWARA, S.; IWASAKA, H.; HASEGAWA, A. et al. Filtration leukocytapheresis therapy ameliorates lipopolysaccharide induced systemic inflammation in a rat model. *Journal of Surgical Research.* v. 171, p. 777 – 782, n. 2, 2011.
- IKEDA, S.; TAKAHASHI, A. H.; SUGA, B. Y. Therapeutic depletion of myeloid lineage leukocytes in patients with generalized pustular psoriasis indicates a major role for neutrophils in the immunopathogenesis of psoriasis. *Journ. Am. Acad. Dermatol.*, v. 68, n. 4, p. 609- 617, 2013.
- KUMAGAI, T.; TAKEYAMA, N.; YABUKI, T. et al. Apheresis of activated leukocytes an immobilized polymyxin B in a patients with septic shock. *Shock.* v. 34, n. 5, p. 461 – 466, 2010
- LASKOSKI, L. M.; VALADÃO, C. A. A; DITTRICH, R. L. et al. An update on laminitis. *Cienc. Rural.* v. 46, n. 3, 2016.
- LEISE, B. S.; FALEIROS; R. R.; WATTS, S, M.; et al. Lamellar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis. *Equine Vet. J.* v. 43, n. 1, p. 54 – 61, 2011.
- LIMA, L. R.; MENDES H. M. F.; MAGALHÃES, J. F.; MARKOWICZ, L. C. et al. Avaliação clínica e hematológica de equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofructose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2. *Pesq. Vet. Bras.* v.33, n.8, p. 992-998, 2013.
- LIMA, L. R.; MENDES, H. M.F.; SORIANI, F. M. *et al.* Histologic and inflammatory lamellar changes in horses with oligofructose-induced laminitis treated with a CXCR1/2 antagonist. *Pesq. Vet. Bras.* v.36, n.1, p. 13-18, 2016.
- McGOWAN, C. The role of insulin in endocrinopathic laminitis. *J. Equine Vet. Scienc.* v. 28, n. 10, p. 603 – 607, 2008.
- McGOWAN, C.; SILENCE, M. N.; POLLITT, C. Hyperinsulinemic laminitis. *Vet. Clin. Equine.* v. 26, p. 257 - 264, 2010.
- MILINOVICH, G.J.; TROTT, D.J.; BURRELL, P.C. et al. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environmental Microbiology.*, v. 8 n. 5, p. 885-898, 2006.

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

MILLER, F. W.; LEITMAN, S. F.; CRONIN, M. E. et al. Controlled trial of plasma exchange and leukapheresis in polymyositis and dermatomyositis. *New England J. Medic.*, v. 326, n. 21, p. 1380-1384, 1992.

NOURIAN, A. R. et al. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24–30 hours after induction with oligofructose. *Equine Vet. J.* v. 39, n.4, p. 360-364, 2007.

PINTO, A. P. S.; SOUZA, P. M. S.; ANDRADE, S. L. Papel da plasmaférese na terapêutica da púrpura trombocitopênica: revisão sistêmica. *Ciênc. Biol. Saúd. Fits*, v. 1, n. 2, p. 61-66, 2013.

TADROS, E. M.; FRANK, N.; HOROHOV, D. W. Inflammatory cytokine gene expression in blood during the development of oligofructose-induced laminitis in horses. *J Equine Vet. Sc.* v. 33, p. 802-808, 2013.

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

VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Equine laminitis model: lamellar histopathology seven days after induction with oligofructose. *Equine Vet. J.* v. 41, n.8, p. 735-740, 2009.

VAN EPS, A. W.; LEISE, B. S.; WATTS, M. et al. Digital hypothermia inhibits early lamellar inflammatory signaling in the oligofructose laminitis model. *Equine Vet. J.* v.44, p.230-237, 2012.

VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C.; UNDERWOOD, C. et al. Continuous digital hypothermia initiated after the onset of lameness prevents lamellar failure in the oligofructose laminitis model. *Equine Vet. J.* p. 01 - 06, 2013.

WALSH, D. M.; BRUNS, T. A. Historical perspective on equine laminitis s: Leukocytes. In: James K Belknap. (Org.). *Equine Laminitis*. 1ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2017, v. p. 122-151.

ZHI-GAO, H.; HUANG, J.; SHUN-GANG, Z. et al. Peripheral leukocytapheresis attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in vivo. *Mediat. Inflamm.* v.1, p 1-9, 2012.

CAPÍTULO 2 - NOVA TÉCNICA DE BIÓPSIA DO TECIDO LAMELAR DO CASCO DE EQUINOS

RESUMO

A análise do tecido lamelar do casco é fundamental para o melhor entendimento da fisiopatologia da laminite. O objetivo foi validar em equinos o uso do lamelótomo de Falcão-Faleiros, um instrumento especificamente projetado para realizar biópsias do extrato lamelar de animais ungulados. Utilizaram-se nove equinos adultos. Sob sedação, anestesia local e após antisepsia da muralha, uma área de 4 cm de comprimento por 1 cm de largura do tecido córneo da parede dorsal do casco foi desgastada com um escariador circular acoplado a uma microretífica. A biópsia foi obtida pela inserção da ponta ativa do lamelótomo borda lateral que foi deslocada, rente à falange distal, até a extremidade oposta à de sua inserção, desconectando e removendo a amostra. Após mensuração, um terço da amostra foi submetido ao exame histopatológico. Antes e após o procedimento, os equinos foram avaliados para sensibilidade dolorosa durante um período de 60 dias, utilizando-se a pinça de casco e o exame de claudicação de acordo com a escala padronizada. Projeções radiográficas látero-mediais foram obtidas antes e 30 dias após o procedimento, realizando-se a análise biométrica da relação espacial entre falange distal e estojo córneo. O efeito do tempo sobre as variáveis foi avaliado estatisticamente ($P < 0,05$). As biópsias resultaram em amostras em média ($\pm DP$) de 2,32 ($\pm 6,37$) cm de comprimento, 0,48 ($\pm 0,09$) cm de e 0,51 ($\pm 0,11$) cm de profundidade. A integridade estrutural do extrato lamelar e derme profunda foi totalmente preservada, sem distorções anatômicas, recuperando-se em média 23 ± 7 lamelas primárias íntegras pelo terço de fragmento histologicamente analisado. Claudicação e sensibilidade à pinça de casco foram evidentes nos primeiros quatro dias, com equivalência aos níveis basais já após 5 dias. Não se verificou qualquer alteração patológica nos exames radiográficos e apenas uma entre doze medidas radiográficas foi diferente da basal após 30 dias. As feridas cicatrizaram sem complicações e os animais retornaram totalmente às suas atividades normais 60 dias após o procedimento. Conclui-se que o uso da técnica de biópsia do tecido laminar do casco utilizando o lamelótomo de Falcão-Faleiros foi plenamente satisfatório, produzindo amostras histológicas em quantidade e qualidade adequadas e permitindo o completo reestabelecimento dos equinos.

Palavras chaves: Equinos, laminite, tecido lamelar, biópsia.

ABSTRACT

Analysis of the lamellar tissue of the hull is fundamental for a better understanding of the pathophysiology of laminitis. The objective was to validate in horses the use of Falcão-Faleiros lamelotome, an instrument specifically designed to perform biopsies of the

lamellar extract of ungulate animals. Nine adult horses were used. Under sedation, local anesthesia and after wall antiseptics, an area 4 cm long by 1 cm wide of the corneal tissue of the dorsal wall of the hoof was worn with a circular reamer coupled to a microretically. The biopsy was obtained by insertion of the active tip of the lateral border lamellectomy that was displaced, close to the distal phalanx, to the opposite end of its insertion, disconnecting and removing the sample. After measurement, one third of the sample was submitted to histopathological examination. Before and after the procedure, the horses were evaluated for pain sensitivity during a period of 60 days, using the hoof clamp and the lameness examination according to the standardized scale. Radiographic projections lateromedials were obtained before and 30 days after the procedure, being realized the biometric analysis of the spatial relationship between distal phalanx and corneal case. The effect of time on the variables was evaluated statistically ($P < 0.05$). Biopsies resulted in mean (\pm SD) samples of 2.32 (\pm 6.37) cm in length, 0.48 (\pm 0.09) cm and 0.51 (\pm 0.11) cm in depth. The structural integrity of the lamellar extract and the deep dermis was completely preserved, without anatomical distortions, recovering on average 23 ± 7 intact primary lamellae per third of the histologically analyzed fragment. Lameness and sensitivity to hoof tweezers were evident in the first four days, with equivalence to basal levels already after 5 days. There was no pathological change in radiographic examinations and only one of twelve radiographic measurements were different from baseline after 30 days. The wounds healed without complications and the animals returned fully to their normal activities 60 days after the procedure. It was concluded that the use of the laminar biopsy technique of the hoof using the Falcão-Faleiros lamellectomy was fully satisfactory, producing histological samples in adequate quantity and quality and allowing the complete reestablishment of the horses.

Key words: Equine, laminitis, laminar tissue, histopathology, biopsy

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de décadas de pesquisa, a análise de amostras do tecido lamelar do casco de equinos tem sido fundamental para o atual entendimento das alterações fisiopatológicas promovidas pelas diversas formas de laminite equina (Galey et al., 1991, Pollitt 1996, Faleiros et al., 2004, Black et al 2005, Asplin et al., 2010, Faleiros et al., 2011, Van Eps et al., 2011, Laskoski et al., 2015).

Para obtenção de amostras de tecido lamelar, quase a totalidade dos estudos experimentais tem recorrido à eutanásia, enquanto que estudos clínicos se limitam ao uso de animais que vierem a óbito (Galey et al., 1991, Pollitt 1996, Faleiros et al., 2004, Black et al., 2006, Asplin et al., 2010, Faleiros et al., 2011, Van Eps et al., 2012, Laskoski et al., 2015). Todavia, estudos recentes têm demonstrado as vantagens do uso de biópsias para avaliação seriada do tecido lamelar em modelos de laminite (Visser e Pollitt 2011a, Visser, Pollitt 2011b, Visser e Pollitt 2012). Já existem descritas algumas

técnicas de obtenção de biópsias do tecido lamelar de equinos (Hanly et al., 2009; Gravena, 2010), contudo ainda sem descrição do uso de um instrumento específico para este fim.

O objetivo do presente estudo é verificar em equinos a viabilidade e eficácia do uso de um instrumento cirúrgico denominado lamelótomo Falcão-Faleiros, que foi especificamente desenvolvido para obtenção amostras de tecido lamelar em animais ungulados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de ética Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com o número de protocolo 49/2014. Foram utilizados 9 equinos adultos, 5 fêmeas e 4 machos, mestiços da raça Mangalarga Marchador, com idade de 4 anos, com peso médio de $316 \pm 62,68$ kg, previamente vermifugados e vacinados. Esses animais foram considerados clinicamente saudáveis por meio de exames físico e hematológicos de rotina. Nenhum dos equinos apresentou reação positiva aos testes rotineiros de claudicação ou resposta alterada ao teste de pinça de casco.

Durante o período experimental, os equinos foram alojados em baias individuais com cama de maravalha e alimentados com de feno de gramínea *Cynodon dactylon* (L.) Pers. Var. “Coast cross” e concentrado comercial (Guabi Equitage Laminados).

2.1. TÉCNICA DE BIÓPSIA

Após jejum prévio alimentar sólido e hídrico de 12 e 6 horas respectivamente, os equinos foram sedados com a associação de cloridrato de xilazina a 10% (0,25 mg/kg) e acepromazina a 1,0% (0,03 mg/kg) por via IV. Para a dessensibilização dos cascos torácicos foi realizado o bloqueio dos nervos digitais palmares lateral e medial na região dos ossos sesamóides proximais com o uso de cloridrato de lidocaína a 2%, no volume de 3 ml em cada ponto de administração.

Para realização da biópsia utilizou-se o instrumento cirúrgico denominado lamelótomo de Falcão-Faleiros segundo pedido de patente do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INP-BR102013018765-8). Inicialmente, após antissepsia da muralha, uma área de 4x1 cm foi demarcada na porção mais dorsal da parede do casco a uma distância de 3 cm distal à borda coronária. A seguir, o tecido córneo dessa área foi desbastado utilizando-se um escariador chato de 9,5 mm de diâmetro, previamente autoclavado, que foi acoplado a uma microretífica (Dremel Série 300®). O tecido foi desbastado sem atingir o extrato lamelar, até o ponto em que o tecido córneo se tornasse flexível quanto pressionado por pinça Kelly. Neste momento, um garrote foi aplicado acima da região

do boleto, com o intuito de reduzir a hemorragia durante a realização da extração da amostra da biópsia.

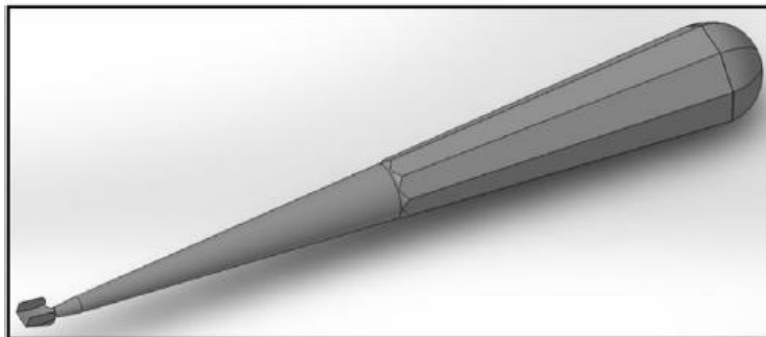


Figura 1: Ilustração do Lamelótomo Falcão-Faleiros (INPI-BR 102013018765-8).

A partir daí o tecido lamelar foi incidido nos limites internos da área desbastada. Para tanto, utilizou-se um bisturi número 22 montado em cabo 4, que avançou de forma perpendicular pela fina camada de tecido córneo, passando pelo extrato lamelar, até atingir a derme profunda. O lamelótomo foi então posicionado de forma perpendicular na borda lateral da incisão e pressionado no sentido axial até a derme profunda, quando foi avançado de forma paralela à falange distal até atingir o limite medial da área desbastada, permitindo assim a apreensão e a extração da amostra tecidual.

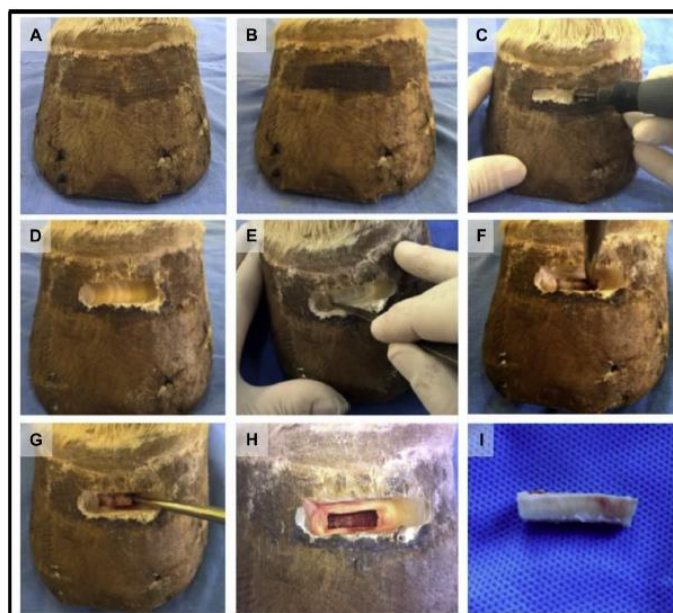


Figura 2: Sequencia fotográfica de procedimentos de biópsia lamelar com o lamelótomo de Falcão-Faleiros mostrando a demarcação do local da biópsia (A-B), o desbaste do tecido queratinizado com um cortador plano ligado a uma ferramenta elétrica rotativa (C-D), a incisão das margens internas com um bisturi (E), a inserção (F-G) e o avanço do lamelótomo. Observação da ferida cirúrgica (H) e da amostra (I).

As dimensões das amostras foram obtidas e registradas com auxílio de um paquímetro. Um fragmento correspondente a um terço da amostra foi imediatamente imergido em formalina 10% tamponada, para futura análise histopatológica.

Os equinos receberam uma dose de soro antitetânico (5.000 UI/kg, SC), fenilbutazona (2,2 mg/kg, IV, 24/24h) durante 3 dias e sulfadoxina mais trimetoprim (10 mg/kg, IV, 24/24h) durante 5 dias. Após remoção do coágulo com soro fisiológico, o local da biópsia foi obliterado com resina autopolimerizável de metilmetacrilato e o casco foi envolvido com atadura de crepom. O curativo foi trocado a cada 3 dias por um período de 10 dias, utilizando-se uma solução de clorexidina a 0,2% para a limpeza da ferida.

2.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os equinos foram avaliados quando à sensibilidade dolorosa nos cascos no dia anterior e 1, 2, 3, 4, 5, 30 e 60 dias após a biópsia por meio do exame de claudicação e pelo teste da pinça de casco. Para a análise do grau de claudicação os animais foram avaliados por três examinadores diferentes de maneira individual e independente. Os exames foram registrados em vídeo e ocorreram em superfície dura e reta, nos andamentos de passo e trote em linha reta e em uma sequência padrão. A claudicação foi graduada de acordo com a escala de 0 a 5 padronizada pela American Association of Equine Practitioners (AAEP, 1996).

Nos mesmos intervalos, a pinça de casco foi aplicada com compressão de forma padronizada em toda a extensão casco afim de determinar o grau de sensibilidade dolorosa. A sensibilidade foi graduada seguindo a seguinte escala: 0) sem resposta frente a compressão moderada; 1) resposta de baixa intensidade frente a pressão moderada 2) resposta evidente frente a pressão moderada e 3) resposta evidente frente a pressão de baixa intensidade.

Avaliações radiográficas foram realizadas no dia anterior e depois de 30 dias da biópsia. Para tanto, foram realizadas exposições lateromediais dos dois membros torácicos utilizando um aparelho de raios X (EcoRay CO., Ltda 1060HF – Korea), dotado de distanciador com iluminação laser, com o objetivo de se visualizar a relação espacial entre falange distal e estojo córneo. As exposições foram realizadas sempre com 80Kv e 2,5mAs. A uma distância padrão, os membros torácicos foram posicionados simultaneamente sobre uma estrutura de madeira com 10 cm de altura, para possibilitar o melhor posicionamento do cassete radiográfico. Para facilitar a identificação radiográfica da superfície linha coronária, uma estrutura metálica de 5 cm de comprimento com 3 mm de largura foi posicionada na superfície dorsal do casco.

Após a revelação digital (REGIUS MODEL 110[®]), as imagens foram analisadas através do programa computacional Metron-Hoof-Pro, versão 5.19. Sempre antes de realizar as mensurações foi utilizado o comprimento do marcador radiopaco para corrigir o fator de

ampliação. Foram determinadas as seguintes variáveis: distância entre os planos horizontais entre a banda coronária e o ápice do processo extensor da falange distal (Founder distance), profundidade ou espessura de sola (sole thickness), ângulo da parede dorsal do casco (Hoof angle), distâncias entre as superfícies dorsais da falange distal e da parede do casco, proximal (HL distance proximal) e distal (HL distance distal), porcentagem do suporte de pinça (toe suport), comprimento da falange média (P2 length), ângulo da articulação interfalângica distal (coffin joint angle), ângulo da articulação interfalângica proximal (pastern joint angle), ângulo entre as superfícies dorsais da falange distal e da parede do casco (pastern joint angle), ângulo do eixo casco-quartela (palmar angle) e a distância entre o ápice da falange distal com o ápice distal do tecido córneo (breakover) (Thrall, 2002, Rocha et al., 2004).

2.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

48 horas após imersão em formalina, as amostras foram desidratadas em álcool e processadas de forma rotineira para inclusão em parafina. Com intuito de analisar a integridade anatômica das amostras e quantificar as lâminas epidérmicas primárias íntegras, cortes de 6 μm foram corados utilizando a técnica de PAS. O número lâminas epidérmicas primárias (LAM) íntegras foi determinado para cada fragmento histológico. O número de LAM íntegras por biópsia foi calculado por regra de três (o resultado da multiplicação do número de LAM pela área total da biópsia foi dividido pela área do fragmento histológico)

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O efeito do tempo sobre os graus de claudicação e de resposta à pinça de casco foram avaliados pelo teste de Friedman e foi calculado a média com seus respectivos desvios padrões. Para a verificação das variáveis observadas pelo programa Metron-Hoof entre as duas coletas a análise estatística de escolha foi o teste t de Student. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram avaliadas pelo teste de Mann Whitney. Considerou-se o nível de significância de $P < 0,05$. O programa utilizado para os cálculos estatísticos foi o SIGMA – STAT na versão 4.0.

3. RESULTADOS

As biópsias resultaram em amostras em média (\pm DP) de 2,32 (\pm 6,37) cm de comprimento, 0,48 (\pm 0,09) cm de e 0,51 (\pm 0,11) cm de profundidade. A integridade estrutural do extrato lamelar e derme profunda foi totalmente preservada, sem distorções anatômicas, recuperando-se em média 23 ± 7 lamelas primárias íntegras pelo terço de fragmento histologicamente analisado (Figura 4).

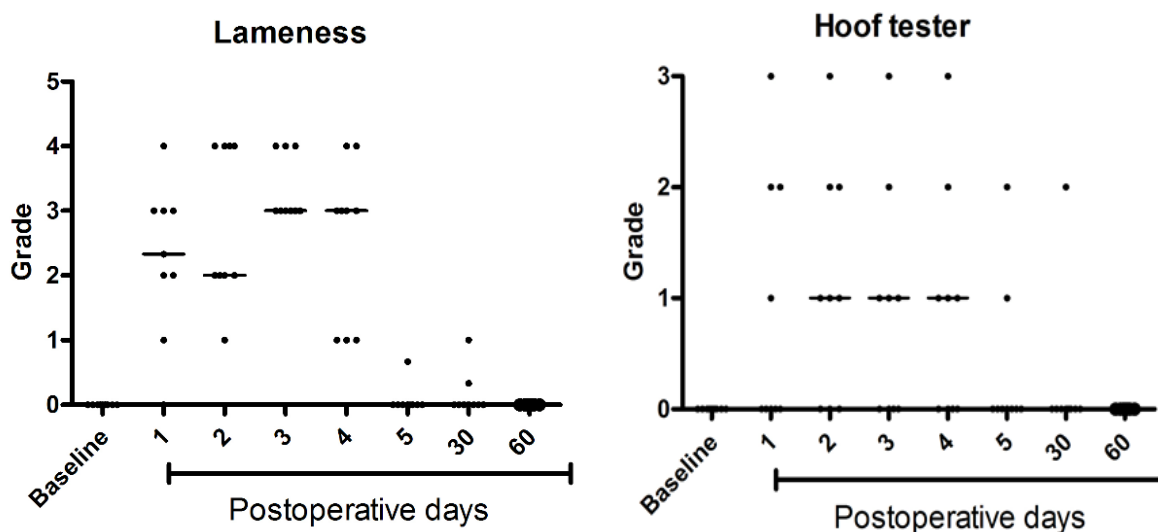


Figura 3. Graus e mediana (traço) de claudicação (lameness) e resposta ao hoof tester em equinos submetidos à biópsia do tecido lamelar do casco.

As feridas cicatrizaram sem complicações. Houve sensibilidade dolorosa principalmente nos primeiros quatro dias, com presença de claudicação de graus 1 a 4 e sensibilidade de graus 1 a 3 (Figura 5). Entretanto, em ambos os casos, as medianas já apresentaram valor equivalente a zero no quinto dia. Apenas dois equinos ainda apresentaram sensibilidade discreta aos 30 dias, que não foi mais perceptível aos 60 dias.



Figura 4: Fotografia do fragmento da amostra de biópsia submetida à análise histológica. Observe a camada fina de tecido queratinizado no topo seguido por várias lamelas epidérmicas primárias no meio e fundo derme na parte inferior.

Os valores médios e os desvios padrões das variáveis observadas pelo programa Metron-Hoof-Pro e sua análise estatística estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Médias e seus desvios padrões com os coeficientes do teste t Student de parâmetros morfométricos obtidos pela projeção radiográfica lateromedial de equinos submetidos à biópsia de casco.

Variable	Before		30 days after		P value
	Mean	SD	Mean	SD	
Palmar Angle	14,54	3,94	15,53	3,87	0,596
Founder distance	0,84	0,39	1,03	0,33	0,270
Sole thickness	1,70	0,30	1,50	0,31	0,176
Hoof angle	49,17	3,48	51,64	2,41	0,099
HL distance proximal	1,64	0,19	1,83	0,16	0,032
HL distance distal	1,56	0,18	1,63	0,12	0,348
Toe suport	80,83	6,24	78,04	5,92	0,345
Coffin joint angle	4,79	7,51	4,68	10,04	0,980
Pastern joint angle	6,29	1,85	3,99	3,05	0,185*
P2 Length	3,77	0,20	3,74	0,20	0,825*
Rotation angle	-1,96	2,16	-2,06	1,79	0,922
Break over distance	3,10	0,54	2,95	0,32	0,485

* Valores de P obtidos pelo teste de Mann-Whitney.



Figura 5: Fotografias consecutivas do mesmo cavalo realizadas antes (A) e 1 (B), 30 (C) e 180 (D) dias após biópsia do casco usando o lamelótomo de Falcão-Faleiros. Note que o defeito do casco atingiu a superfície do solo após 6 meses sem qualquer tipo de anormalidade proximal.

4. DISCUSSÃO

Todas as colheitas aconteceram dentro do planejado, sem que houvesse qualquer tipo de reação indesejável por parte dos equinos. Uma etapa importante do procedimento foi o desgaste da camada córnea que delimita e dá forma à área a ser removida e também permite a introdução do instrumento de biópsia no extrato lamelar. Estudos anteriores comumente se utilizaram de brocas circulares montadas em parafusadeiras elétricas para este propósito (Singh et al., 1993, Crosser e Pollit, 2006, Hanly et al., 2009, Canello 2013). Esta estratégia normalmente limita a área de biópsia ao diâmetro da broca utilizada, que realiza sempre um defeito circular. Outros estudos utilizaram equipamento para casqueamento como grosa e rineta (Alves et al., 2004, Paes Leme et al., 2010) ou pedra de esmerilar acoplada em microretífica (Gravena et al 2010). No presente experimento, o uso do escariador plano de 9,5mm de diâmetro, montado a uma microretífica por meio de uma extensão, se mostrou um método mais eficiente por permitir o desgaste do casco na forma e tamanho desejados. Além disso, o uso desse método foi considerado vantajoso por propiciar menor risco de dano ao cavalo ou ao equipamento, caso o animal se mova durante o processo, e por permitir maior acurácia na remoção do tecido córneo, minimizando o risco de lesão ao tecido lamelar.

O lamelótomo de Falcão-Faleiros permite a escolha do comprimento da amostra a ser coletada para a biópsia. Assim o desgaste foi feito na forma de um retângulo paralelo à linha coronária, de forma a obter um maior número de lâminas primárias. No caso das técnicas que utilizam o punch de biópsia (Alves et al., 2004; Gonçalves, 2009; Paes Leme et al., 2010; Hanly et al., 2009; Singh et al., 1993), a dimensão do fragmento fica limitada às margens internas do instrumento.

Outro fator limitante de grande relevância no uso do punch de biópsia é que este instrumento não permite a incisão da derme profunda (Gravena et al, 2010), um tecido resistente em virtude da grande proporção de fibras colágenas, que conecta o extrato lamelar à falange distal. Nesse sentido, alguns autores têm utilizado instrumentos improvisados como uma lâmina de bisturi curvada por aquecimento (Crosser e Pollitt, 2006), ou alternativos como esculpador de Frahm nº 2 (Gravena et al., 2010) associados a pinças de dissecação ou hemostática, que podem danificar a amostra durante a colheita. Essa foi uma das principais preocupações no desenvolvimento do lamelótomo de Falcão-Faleiros. Assim, sua ponta ativa foi desenhada com três lâminas, uma em forma de assoalho e as outras em formas de paredes laterais. Dessa forma, à medida que o lamelótomo avança entre à falange, a derme profunda é incisada pelo assoalho ao mesmo tempo que as bordas do tecido lamelar são incisadas pelas paredes e a amostra tecidual é aprisionada e protegida pelas lâminas.

A eficácia do lamelótomo em preservar as amostras ficou comprovada pela qualidade das amostras histológicas, que apresentaram o extrato lamelar íntegro, com preservação de partes da derme profunda e do tecido queratinizado em suas margens e sem alterações notáveis de sua arquitetura ou artefatos (Figura 4). Mais além, sua capacidade

de produzir amostras com qualidade suficiente para diversos tipos de análise ficou nítida, pelas dimensões das amostras, que foram superiores às relatadas em estudos prévios com biópsias de casco em equinos (Croser e Pollitt 2006, Gravena et al 2010) e bovinos (Canello 2013). Também o número de 23 (± 7) lâminas epidérmicas primárias íntegras aqui relatadas foi superior ao de 12 lâminas relatado em estudo prévio (Gravena et al 2010).

O curativo utilizado nos locais onde as biópsias foram realizadas foi baseado no tratamento adotado por Paes Leme (2010) e a oclusão do orifício oriundo da biópsia foi realizada com resina de metilmetacrilato adaptado da metodologia de Croser e Pollitt (2006). Nenhum animal apresentou sinais de infecção na região da biópsia, corroborando achados anteriores (Gravena et al. 2010).

O grau de claudicação e a sensibilidade do casco apresentaram um comportamento equivalente. Os equinos evidenciaram picos de sensibilidade no casco no terceiro dia e no grau de claudicação no segundo dia após o procedimento da biópsia, havendo drástica redução na sensibilidade do casco e claudicação dentro de cinco dias. Níveis variáveis de claudicação foram observados em estudo anteriores com biópsias equinos (Croser e Pollitt, 2006, Hanly et al. 2009).

Ao se avaliar as mensurações radiográficas do casco antes e após a biópsia (Tab. 2), a única variável com diferença significativa foi a distância média entre as superfícies dorsais da falange distal e do estojo córneo em sua porção proximal, que foi 1.64cm para 1.83 cm. Esta alteração parece ser decorrente do tecido cicatricial formado no local da biópsia e não foi considerada relevante clinicamente, uma vez que as outras medidas não se alteraram e porque não se observou alterações patológicas, como periostite, que pudessem sugerir processo inflamatório ou degenerativo no local.

A completa remissão da claudicação e da sensibilidade à pinça de caso ao final do presente experimento e a ausência de maiores alterações radiográficas clinicamente significantes indicam que a técnica aqui descrita pode ser utilizada para diagnóstico e acompanhamento de casos clínicos de laminite e outras afecções de casco.

5. CONCLUSÃO

Concluiu-se que a técnica de biópsia utilizando o lamelótomo de Falcão-Faleiros foi satisfatória em equinos, produzindo amostras histológicas em quantidade e qualidade adequadas e permitindo o completo reestabelecimento clínico dos animais.

6. REFERÊNCIAS

- AAEP. Guide for veterinary service and judging of equestrian events. 5ed. Lexington, KY: *American Association of Equine Practitioners*, 1996. 63p.
- ALVES, G. E. S.; PAES LEME, F. O.; MARVAL, C. A. et al. Biópsia digital em equinos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos. *Braz. J. Vet. Res. and Animal Science*, São Paulo, v.41, suppl., p.264, 2004.
- ASPLIN, K. E.; PATTERSON-KANE, J. C.; SILENCE, M. N. et al. Histopathology of insulin-induced laminitis in ponies. *Equine Vet J.* v. 42, n. 8, p. 700 – 706, 2010.
- BLACK, S. J.; LUNN, D. P.; YIN, C. et al. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 15, n. 109, p. 161- 166, 2006.
- CANELLO, V. A. Morfologia do tecido Laminar do casco de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Programa de Medicina veterinária, Jaboticabal, 2013.
- CROSER, E. L.; POLLITT, C. C. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. *AAEP Proceedings.* v. 52, p. 542 – 546, 2006.
- FALEIROS, R. R.; STOKES, A. M.; EADES, S. C., et al. Assessment of apoptosis in epidermal lamellar cells in clinically normal horses and those with laminitis. *Amer. Jour. Vet. Research* v.65, n.5, p.578-585, 2004.
- FALEIROS, R. R., JOHNSON P. J., NUOVO G. J., MESSER N. T. et al. Laminar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *J. Vet. Intern., Med.* v. 25, p. 107–115, 2011.
- GALEY, F. D.; WHITELEY, H. E.; GOETZ, T. E. et al. Black walnut (*Juglans nigra*) toxicosis: a model for equine laminitis. *J. Comp. Pathol.* v. 104, n. 3, p. 313-26, 1991.
- GONÇALVES, C. A. P. Apoptose de células epidermais lamelares em equinos com laminite induzida e tratados com anti-inflamatórios não esteroidais. Dissertação de Mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Medicina Veterinária, Seropédica – RJ, 2009.
- GRAVENA, K. Avaliação da integridade dos tecidos dérmico e epidérmico do casco de equinos colhidos pelo acesso trans-mural dorsal. 2010. 50 f. Dissertação de mestrado, Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

HANLY, B. K.; STOKES, A. M.; JOHNSON, J. R.; BELL, A. B. et al. Use of serial laminar tissue collection via biopsy in conscious healthy horses. *Am. J. Vet. Res.* v. 70, n. 6, p. 697 – 702, 2009.

LASKOSKI, L. M.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; VALADÃO, C. A.; et al. Systemic leukopenia, evaluation of laminar leukocyte infiltration and laminar lesions in horses with naturally occurring colic syndrome. *Res. Vet. Sci.* 2015 Aug; 101:15-21. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.05.014. Epub 2015 Jun 5.

PAES LEME, F. O.; BONNA, F. A. B.; De MARVAL, C. A.; XAVIER, S. H. N. et al. Histopatologia das lâminas do casco de equinos com laminite aguda induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.2, p.241-250, 2010.

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

ROCHA, J. V., LISCHER, C. J., KUMMER, M., HASSIG, M., AUER, J. A. Evaluating the measuring software package metron-PX for morphometric description of equine hoof radiographs. *J. Equine Vet. Science.* v. 24, n. 8, p. 347 – 354, 2004.

SINGH, S. S.; WARD, W. R.; MURRAY, R. D. Technique of hoof biopsy in cattle. *Vet. Record*, v.133, p.190-191, 1993.

THRALL, D.E. Textbook of veterinary diagnostic radiology. 4.ed. Philadelphia: Saunders, 2002. 758p.

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 Vet J.* 2012 Mar;44(2):230-7. doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00416. x. Epub 2011 Sep 5.

VISSER, M. B.; POLLITT, C. C. Lamellar leukocyte infiltration and involvement of IL-6 during oligofructose-induced equine laminitis development. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011a Nov 15;144(1-2):120-8. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.07.016.

VISSER, M. B.; POLLITT, C. C. The timeline of lamellar basement membrane changes during equine laminitis development. *Equine Vet J.* 2011b Jul;43(4):471-7. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00292.x.

CAPÍTULO 3 - EFEITO DA LEUCOAFÉRESE SOBRE O LEUCOGRAMA DE EQUINOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE SEPSE

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi descrever a técnica e verificar os efeitos da leucoaférese por fluxo contínuo sobre as contagens de leucócitos sanguíneos em equinos submetidos a um modelo de SIRS pela administração gástrica de oligofrutose. Estudou-se a hipótese de que a leucoaférese de fluxo contínuo é um procedimento seguro e eficaz em reduzir a presença de células inflamatórias circulantes em equinos submetidos a um protocolo de SIRS. A metodologia experimental foi aprovada pelo Comitê de Ética Sobre Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG 281/2013). Foram utilizados seis equinos, fêmeas, sem raça definida com idade média de $10,5 \pm 5$ anos, pesando 381 ± 11 kg. Previamente ao procedimento de separação dos leucócitos, os animais foram submetidos a um protocolo de indução de sepse. Doze horas após a indução, os equinos foram contidos em tronco e ambas as jugulares foram canuladas com cateteres 14 G. Para a separação dos leucócitos, foi utilizada uma máquina com sistema de aférese Cobe Spectra (Terumo BCT, Lakewood USA), com kit comercial Terumo BCT WBC por sistema de coleta por fluxo contínuo com duplo acesso venoso. A separação dos leucócitos foi feita por meio de centrifugação (765 RPM), com fator de separação 500, até serem processados uma média de 16628,1 ml (± 1300 ml) de sangue (a taxa de retirada foi de 75 ml por minuto). Ainda, para facilitar a separação de leucócitos foi administrada, pela via de infusão, solução hidroxetilamido - HES ($\pm 966,67$ ml). O volume de sangue processado foi em média (\pm DP) de 16628 ml (± 275 ml), obtendo-se 682 ml (± 40 ml) de plasma concentrado em leucócitos. O procedimento de leucoaférese se mostrou eficiente em reduzir as contagens de leucócitos totais circulantes já na primeira hora, com uma redução de 18,7%. Nas contagens diferenciais, diferenças estatísticas foram detectadas apenas nos linfócitos na comparação entre T0 e T2. Entretanto, reduções numéricas foram observadas em todos os tipos de leucócitos, como 31% de neutrófilos, 59% de linfócitos, 43,5% de monócitos e a remoção completa de bastonetes. Em conclusão, confirma-se a hipótese de que a leucoaférese de fluxo contínuo é um procedimento seguro e eficaz em reduzir a presença de células inflamatórias circulantes em equinos submetidos a um protocolo de SIRS.

Palavras chaves: Laminite, tratamento, leucócitos.

ABSTRACT

The objective of this research was to describe the technique and verify the effects of leukapheresis by continuous flow on the blood leukocyte counts in horses submitted to a

model of SIRS by gastric administration of oligofructose. We hypothesized that continuous flow leukapheresis is a safe and effective procedure to reduce the presence of circulating inflammatory cells in horses submitted to a SIRS protocol. The experimental methodology was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of UFMG (CETEA / UFMG 281/2013). Six undefined equine females were used, with a mean age of 10.5 ± 5 years, weighing 381 ± 11 kg. Prior to the leukocyte separation procedure, the animals were submitted to a sepsis induction protocol. Twelve hours after induction, the horses were contained in the trunk and both jugulae were cannulated with 14 G catheters. For leukocyte separation, a machine with Cobe Spectra apheresis system (Terumo BCT, Lakewood USA) was used with commercial kit Terumo BCT WBC by dual-access continuous flow collection system. Leukocyte separation was done by centrifugation (765 RPM), with separation factor 500, until an average of 16628.1 ml (± 1300 ml) of blood was obtained (the withdrawal rate was 75 ml per minute). Further, to facilitate the separation of leukocytes, hydroxylamide-HES solution (± 966.67 ml) was infused via the infusion route. The volume of blood processed was (\pm SD) 16628 ml (± 275 ml), obtaining 682 ml (± 40 ml) of plasma concentrated in leukocytes. The leukapheresis procedure proved efficient in reducing total circulating leukocyte counts in the first hour, with a reduction of 18.7%. In differential counts, statistical differences were detected only in lymphocytes in the comparison between M0 and M2. However, numerical reductions were observed in all leukocyte types, such as 31% neutrophils, 59% lymphocytes, 43.5% monocytes, and complete rod removal. In conclusion, the hypothesis that continuous flow leukapheresis is a safe and effective procedure to reduce the presence of circulating inflammatory cells in horses submitted to a SIRS protocol is confirmed.

Key words: Laminitis, treatment, leukocytes.

1. INTRODUÇÃO

A sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica - modernamente denominada como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) - secundária à infecção, e é uma condição comum em cavalos. A SIRS pode ser causada por diversas condições clínicas e pode induzir disfunção de múltiplos órgãos (MODS), que pode ser fatal ou deixar uma seqüela grave, como a laminite equina (Taylor, 2015). Dentro desses conceitos, os neutrófilos juntamente com outros inúmeros mediadores inflamatórios são componentes importantes para o processo fisiopatológico tanto para SIRS quanto laminite (Faleiros et al. 2011). Na última década, essas células ganharam importância no complexo de mecanismo da laminite equina (Faleiros et al., 2011; Lima et al., 2012), sendo que na medicina o estudo de sua depleção na circulação sistêmica é alvo ao combate à sepse (Lewis et al., 2013). Dessa forma, medidas terapêuticas capazes de inibir a migração dos neutrófilos aos órgãos ou sequestrar os leucócitos circulantes podem se tornar terapia promissora na medicina equina, através de técnica denominada leucoaférese.

A aférese é o procedimento caracterizado pela separação de uma parcela do sangue de um paciente, por meio de centrifugação ou filtração, retornando os demais hemocomponentes à corrente sanguínea. De acordo com o componente removido, a aférese pode ser classificada em plasmaférese (plasma), leucoaférese (leucócitos), eritrocitaférese (eritrócitos) e plaquetaférese (plaquetas) (Pinto, 2013). As aféreses podem ser classificadas como transfusionais (retirada de hemocomponente de um doador para uso em outros pacientes com enfermidades) ou terapêuticas (retirada de hemocomponente associado a doença no paciente) (Bernardo et al., 2012).

Aférese, como uma modalidade terapêutica, tem como principal fundamento passar o sangue do paciente através de um dispositivo extracorpóreo, com finalidade de eliminar patógenos ou componentes celulares que condicionam ou perpetuam uma doença e assim, contribuir para o tratamento (McLeod, 2010; Morales, 2011; Fdez-Lomana, 2012). Em humanos, tratamentos aferéticos com a depleção de leucócitos (leucoaférese) são utilizados em diversas doenças como síndrome da hiperviscosidade (leucemia aguda) e hiperleucocitose (leucemia crônica) (Blum e Porcu, 2007), SIRS (Lewis et al., 2013), psoríase (Ikeda et al., 2013), colite ulcerativa (Santos, 2011), pioderma gangrenoso (Fujimoto et al., 2004) e glomerulonefrite (Hasegawa et al., 2004).

Na Medicina Veterinária, técnicas de aférese como a plasmaférese possuem foco na produção de soros hiperimunes e antivenenos (Escodro et al. 2012). Em equinos, foi realizada a plasmaférese experimentalmente para produção de soro hiperimune em 1969 na Índia e logo ocorreu a padronização da técnica (Feige et al., 2002; Feige et al., 2005; Escodro et al., 2013). No Brasil, Escodro et al. (2012) descreveram o primeiro procedimento de plasmaférese automatizada em equinos, sendo que em Escodro et al. (2013) padronizaram a técnica para as condições nacionais, concluindo ser uma técnica de fácil execução e segura. Já em relação à leucoaférese, Gordon et al. (1986) relatam sua realização por fluxo contínuo em dois grupos de equinos hípidos (5 cada) tratados e ou não com hidrocortisona, com objetivo de produção de 300 ml de plasma rico em leucócitos. Nesses estudos, os autores conseguem com resultado uma média maior de leucócitos coletada no grupo tratado. Entretanto, na literatura nacional ou internacional, nenhum trabalho foi encontrado sobre a realização da leucoaférese em equinos com intuito terapêutico.

Devido ao alto potencial terapêutico da leucoaférese e pouca exploração do tema na Medicina Veterinária, esse estudo teve como objetivo descrever a técnica e verificar os efeitos da leucoaférese por fluxo contínuo sobre as contagens de leucócitos sanguíneos em equinos submetidos a um modelo de SIRS pela administração gástrica de oligofrutose. Estudou-se a hipótese de que a leucoaférese de fluxo contínuo é um procedimento seguro e eficaz em reduzir a presença de células inflamatórias circulantes em equinos submetidos a um protocolo de SIRS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia experimental foi aprovada pelo Comitê de Ética Sobre Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG 281/2013). Foram utilizados seis equinos, fêmeas, sem raça definida com idade média de $10,5 \pm 5$ anos, pesando 381 ± 11 kg, escore corporal 6 ± 1 (escore de 1 a 9), prenhes negativa, previamente adaptadas por 01 semana ao confinamento em baia e a uma dieta exclusiva à base de feno de gramínea (*Cynodum sp*). Os animais permaneceram instalados no setor de Cirurgia de Grandes Animais da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) entre os meses de junho e julho.

Previamente ao procedimento de separação dos leucócitos, os animais foram submetidos a um protocolo de indução de sepse. Para tanto, todos os animais receberam 1g/kg de peso vivo de oligofrutose (Raftilose P95 – Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.), diluídos em 3 litros de água, a cada 24 horas por um período de três dias, sendo esse considerado como período de sensibilização. No quarto dia, todos os animais receberam 10g/kg pela mesma via com o mesmo volume, procedimento considerado como indução da sepse (adaptado de Lima et al., 2013; Lima et al., 2016; Van Eps e Pollit, 2006).

Doze horas após a indução, os equinos foram contidos em tronco e, no intuito de minimizar o desconforto durante o período do procedimento, foi realizada a sedação com cloridrato de detomidina (Dormium, Agener União) na dose de $20 \mu\text{g}/\text{kg}$, IV. Em seguida ambas as jugulares foram canuladas com cateteres 14 G (Teflon-Entfe). Para a separação dos leucócitos, foi utilizada uma máquina com sistema de aférese Cobe Spectra (Terumo BCT, Lakewood USA), com kit comercial Terumo BCT WBC por sistema de coleta por fluxo contínuo com duplo acesso venoso, sendo a jugular direita denominada de via de coleta e a esquerda de via de retorno. Nos primeiros 1000 ml de sangue processados não foi realizada a coleta, permitindo o ajuste da camada leucocitária (*buffy coat*). A separação dos leucócitos foi feita por meio de centrifugação (765 RPM), com fator de separação 500, até serem processados uma média de 16628,1 ml ($\pm 1300\text{ml}$) de sangue (a taxa de retirada foi de 75 ml por minuto). Ainda, para facilitar a separação de leucócitos foi administrada, pela via de infusão, solução hidroxetilamido - HES ($\pm 966,67$ ml).

Para evitar coagulação do sangue presente no sistema e no momento da reinfusão, foi associado o anticoagulante citrato dextrose (taxa de infusão de 4ml/min). Os leucócitos foram acondicionados em bolsa de transfusão de sangue de 500 ml (Figura 1). Os demais hemocomponentes foram reinfundidos da via de retorno no animal em fluxo contínuo, simultaneamente à separação dos leucócitos sem contaminação ou manipulação direta do sangue.

Imediatamente após a realização da leucoaférese, todos os animais desse grupo foram sondados com uma sonda nasogástrica de 11mm para administração de fluido enteral constituído de 80,55g de cloreto de sódio (NaCl), mais 5,55g de cloreto de potássio (KCl) e 56,7g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) diluídos em 15 litros de água na dose de 30 ml/kg/hora. Esta terapia durou um período de 12 horas. Se algum animal apresentasse sinais de MODS com grave deterioração orgânica e como forma de impedir o extremo sofrimento a eutanásia seria realizada.

2.1. COLETAS DE SANGUE

Imediatamente antes (M0), a cada hora durante (M1 a M3) e ao final (M4) do procedimento aferético, amostras de sangue foram coletadas dos equinos pela via coleta. Amostras da bolsa reservatória contendo o conteúdo leucocitário extraído pela leucoaférese também foram obtidas de M1 a M4. Tais amostras foram acondicionadas em 3 tubos distintos (sem anticoagulante, com ácido etileno-diamino-tetracético e com fluoreto de sódio) e refrigeradas imediatamente até a realização de leucograma e separação de soro e plasma. As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas por 5 min, a 3000G até completar a separação da fração líquida (soro) que foi armazenada em freezer a -20°C.

O leucograma foi determinado em cada uma das amostras por meio da contagem total em aparelho automatizado (Abacus Junior Vet) seguido de contagem diferencial realizada em esfregaços sanguíneos corados com panótico, avaliando-se 100 células. O cálcio total também foi mensurado nas amostras de plasma em fluoreto, obtidas após centrifugação durante 6 min a 3.000 rpm. Essa análise foi realizada em aparelho espectrofotométrico automático (Cobas-Mira Plus), utilizando kit comercial específico (Biotécnica).

Os dados foram analisados pelo programa Prism 5 for Windows 5.00 utilizando o teste de normalidade KS e análise de variância em blocos ao acaso, seguido do teste de Student Newman Keuls para comparação de médias entre tempos. Considerou-se um nível de significância de $P < 0,05$.



Figura 1: Foto mostrando procedimento de leucoaférese em um equino (A), o equipamento utilizado para o procedimento (B), uma bolsa de coleta de leucócitos após o procedimento (C e D), e a capa leucocitária nas setas vermelhas (C e D).

3. RESULTADOS

Os dados referentes ao peso, taxa de filtração, fluxo de aspiração, volume de anticoagulante, volume final de líquido leucocitário, volume total de sangue processado, tempo de procedimento e volume de hidroxetilamido utilizados por equino estão sumarizadas na Tabela 1. O volume de sangue processado foi em média (\pm DP) de 16628 ml (\pm 275 ml), obtendo-se 682 ml (\pm 40 ml) de plasma concentrado em leucócitos. O tempo total médio para realização do procedimento foi de 241,83 min (\pm 72 min). Foram gastos 1289,5 ml de anticoagulantes e uma média de 966,66 ml de hidroxetilamido em solução de cloreto de sódio (HES) durante o processamento e para a reinfusão dos remanescentes sanguíneos nos animais.

Os valores dos dados dos leucogramas e contagem de plaquetas dos animais e das bolsas de coletas juntamente com as informações das variáveis informadas pelo equipamento de leucoaférese durante o procedimento encontram-se presentes na tabela 2. As concentrações plasmáticas de cálcio total estiveram entre o $13,45 \pm 1,22$ mg/dL (M0) e $14,45 \pm 1,73$ mg/dL (M4), sem que houvesse diferenças entre elas em qualquer momento.

Tabela 1: Parâmetros avaliados no grupo de equinos Mangalarga Marchador com sepse induzida por oligofrutose e submetidos ao procedimento de leucoaférese.

Animais	Peso (kg)	Constante (45ml/kg)	Fluxo de aspiração Maq. Afér (ml/kg)	Anticoagulante (citrato de dextrose - ml)	Volume final da bolsa de coleta (ml)	Total de sangue processado (ml)	Tempo dos procedimentos (min)	Anticoagulante (citrato de dextrose) na bolsa de coleta	HES (ml)
1	390	17550	70	1349	718	17500	251	78	1000
2	390	17550	70	1322	686	17000	256	75	1000
3	370	16650	70	1169	618	15054	217	66	900
4	380	17100	70	1313	700	17000	245	75	1000
5	400	18000	70	1335	709	17000	150	75	1000
6	360	16200	70	1249	666	16215	232	71	900
Médias	381,67	17175	70	1289,5	682,83	16628,17	225,17	73,33	966,67

HES= hidroxietilamido em solução de cloreto de sódio; (min) =minutos; (kg)= quilograma; (ml) = mililitros; Maq. Afér = máquina de aférese

Tabela 2: Leucogramas de sangue venoso e de líquido leucocitário (bolsa de coleta) obtido antes (T0), uma (T1), duas (T2) e três (T3) horas durante e ao final (T4) do procedimento de leucoáfereze em equinos Mangalarga Marchador com sepse induzida por oligofrutose.

		SANGUE VENOSO					LÍQ. LEUCOCITÁRIO (bolsa de coleta)			
		T0	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Leucócitos	Média	10,42	8,47*	7,82*	7,55*	7,93*	27,25	27,85	24,4	27,88
(10 ³ cels/μL)	DP	2,59	1,76	0,89	1,7	2,73	6,83	6,17	9,87	5,33
Segmentados	Média	6,39	5,51	3,93	4,64	4,4	17,69	15,75	17,02	12,14
(10 ³ cels/μL)	DP	2,4	1,65	2,29	1,17	2,99	4,75	9,31	7,2	10,26
Monócitos	Média	0,39	0,3	0,25	0,2	0,16	1,28	0,97	0,59	0,48
(10 ³ cels/μL)	DP	0,28	0,22	0,37	0,26	0,25	1,03	0,55	0,57	0,47
Linfócitos	Média	3,1	1,99	1,58*	2,24	1,78	7,32	5,77	4,66	3,99
(10 ³ cels/μL)	DP	0,86	0,79	0,94	0,94	1,17	2,17	3,16	3,88	3,36
Eosinófilos	Média	0,3	0,32	0,29	0,19	0,1	0,7	0,67	0,2	0,24
(10 ³ cels/μL)	DP	0,24	0,21	0,26	0,15	0,12	0,41	0,8	0,29	0,26
Basófilos	Média	0,12	0,03	0,07	0,04	0,07	0,12	0,24	0,19	0,29
(10 ³ cels/μL)	DP	0,13	0,05	0,15	0,06	0,1	0,19	0,24	0,32	0,34
Bastonetes	Média	0,1	0,25	0,14	0,17	0	0,14	0,07	0,41	0,38
(10 ³ cels/μL)	DP	0,22	0,6	0,31	0,38	0	0,14	0,16	0,71	0,93
Plaquetas	Média	189	180	179	190	162	95	103	151	106
(10 ³ cels/μL)	DP	32,07	40,37	14,57	29,67	23,71	33,52	20,48	26,42	15,54

* Difere de T0 (P<0,05); LÍQ. = líquido

4. DISCUSSÃO

O termo síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) é usado para descrever inflamação sistêmica que pode ser causada por agentes infecciosos (por exemplo, bactérias, fungos e vírus) ou causas não infecciosas (por exemplo, trauma, queimaduras, pancreatite) (Taylor, 2015). No presente estudo, a administração de oligofrutose por sonda foi a responsável pelo desenvolvimento deste quadro. A ação desse carboidrato solúvel sobre a microbiota intestinal dos equinos está muito bem documentada. Por não ter enzima específica para sua digestão no intestino delgado, a oligofrutose chega inalterada ao intestino grosso, produzindo rápida proliferação de várias espécies de estreptococos e outras cepas de bactérias. A consequência é a produção de grandes quantidades de ácido lático que reduzem o pH cecal normal (pH de 6,2 a 6,8) para níveis inferiores a pH 5 e causam a lise de bactérias gram-negativas (Milinovich et al., 2006; Milinovich et al., 2010).

Já é comprovada que a principal repercussão da alteração da microbiota cecal seja a absorção de toxinas bacterianas modernamente denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os lipopolissacarídeos (LPS) resultantes da morte das gram-negativas (endotoxinas), associados aos peptidoglicanos, ácido lipoteicóico, aminas vasoativas e exotoxinas liberados devido à rápida proliferação de gram-positivas, seriam os principais PAMPs a serem absorvidos pela mucosa cecal, chegando à corrente sanguínea (Visser e Pollitt, 2011). Picos nas concentrações plasmáticas de LPS seguidos de picos do fator de necrose tumoral (TNF- α) têm sido descritos respectivamente 8h e 12/24h após a administração dessa mesma dose de oligofrutose em equinos (Bailey et al., 2009). Tais achados explicam o quadro SIRS verificado no presente estudo e comprovam o modelo utilizado.

A implementação da leucoaférese não necessitou de nenhuma estrutura física especial além das já presentes no setor de Cirurgia de Grandes Animais. Durante o procedimento, os animais não mostraram nenhuma mudança comportamental, mas era necessário que uma pessoa permanecesse próxima à cabeça para que eles não removessem os equipamentos e os cateteres. Mesmo sendo um procedimento com máquina automatizada, optou-se pela presença de um técnico experiente junto à máquina de aférese para a averiguação da necessidade de substituição dos frascos que continham anticoagulantes e outras soluções, além de auxiliar caso houvesse alguma interferência com a máquina ou com as vias de acessos venosos nos animais.

No período trans-aférese do animal 2 houve redução do fluxo, sendo necessário reposicionamento do cateter. Esse mesmo animal apresentou os menores valores das variáveis aferidas nessa pesquisa e acredita-se que isso possa ser justificado pelo seu menor peso e pela coincidência em que perdeu-se um dos acessos venosos já se aproximando do fim da leucoaférese optando-se por interromper o procedimento. De

forma semelhante, no animal 4, também houve problemas com o cateter de retirada, mas foi resolvido rapidamente sem a necessidade de troca desse acesso.

Mesmo se resolvendo rapidamente, os imprevistos citados vão ao encontro de Escodro et al., (2012) que relatam problemas com a obstrução das vias de coleta ou retorno e ao contrário de Feiger et al. (2003) e Feiger et al. (2005), que não relataram nenhum problema referente as vias de acesso venoso em procedimento de plasmaférese. Gordon et al. (1986a) utilizaram agulhas de metal 14G e consideraram eficientes para a realização do procedimento de leucoaférese em 15 animais. Mesmo com esse pequeno contratempo, os cateteres de teflon 14 G foram considerados eficazes em manter as vias sem causar nenhuma formação de trombos ou infecções após os procedimentos.

No presente estudo utilizou-se uma velocidade de 765rpm para separação de leucócitos. A escolha foi com base em estudos anteriores que demonstram que procedimentos aferéticos com velocidades entre 700 e 750 rpm foram mais eficientes em separar leucócitos equinos quando comparados com aqueles que utilizaram velocidades entre 800 e 1500 rpm (Gordon et al. 1986 a; Gordon et al. 1986 b).

O procedimento de leucoaférese se mostrou eficiente em reduzir as contagens de leucócitos totais circulantes já na primeira hora, com uma redução de 18,7%. Nas contagens diferenciais, diferenças estatísticas foram detectadas apenas nos linfócitos na comparação entre M0 e M2. Entretanto, reduções numéricas foram observadas em todos os tipos de leucócitos, como 31% de neutrófilos, 59% de linfócitos, 43,5% de monócitos e a remoção completa de bastonetes.

Quanto às contagens do plasma leucocitário que foi removido, não se observaram alterações, ficando os valores numéricos muito semelhantes durante todo o período de aférese. Tais achados comprovam a eficácia da técnica e do equipamento utilizado, que removeram de forma constante os leucócitos circulantes.

Ao se comparar as contagens médias dos leucócitos desta pesquisa de 10.42×10^3 cels/ μ L em T0 para sua menor contagem de 7.55×10^3 cels/ μ L (M3) e da realizada por Gordon et al. (1986b) que obtiveram valor basal médio de 10.0×10^3 cels/ μ L para 6.4×10^3 cels/ μ L ao final, observa-se maior eficiência na segunda (36% de redução) em relação à atual (redução de 27,5%). Entretanto é necessário ressaltar que na pesquisa atual os equinos apresentavam quadro de SIRS, que estimulava o constante aporte de células inflamatórias para a circulação durante o procedimento.

Ao final do procedimento, contagens menores de neutrófilos ($3,93 \times 10^3$ cels/ μ L) e linfócitos ($1,58 \times 10^3$ cels/ μ L) foram conseguidos nessa pesquisa se comparado as contagens neutrófilos ($4,0 \times 10^3$ cels/ μ L) e linfócitos ($1,8 \times 10^3$ cels/ μ L) descritas por Gordon et al. (1986b). Talvez, essas pequenas diferenças possam ser explicadas pela diferença dos equipamentos utilizados. Esses autores relataram que utilizaram um separador de sangue de fluxo contínuo diferente da que foi usada nesse trabalho. Ainda,

pelo ano em que foi realizado o trabalho desses autores e o ano em que foi realizada a pesquisa atual, houve uma evolução de tecnologia das máquinas e kits utilizados para tais finalidades.

Não foi objetivo dessa pesquisa a coleta de plaquetas, porém, essas células acabaram sendo sequestradas pelo procedimento. Isso também foi verificado em estudos anteriores com procedimentos de leucoaférese em equinos (Gordon et al. 1986 a; Gordon et al. 1986 b). No presente estudo, suas contagens variaram entre 95.000 e 151.000 unidades/uL e não interferiram significativamente nas contagens sanguíneas que se mantiveram inalteradas (entre 162.000 e 190.000 unidades/uL) durante todo período experimental.

No presente estudo as concentrações plasmáticas de cálcio de mantiveram inalteradas e não houve qualquer sinal clínico de hipocalcemia nos equinos. Entretanto, procedimentos de aférese podem ocasionar hipocalcemia relacionada com perda ou retirada da sua fração livre (Ionizado) ou ligado à albumina (Cálcio total). A fixação de cálcio livre em albumina recém-infundida também pode contribuir para essa complicação. Isso ocorre principalmente nas aféreses que utilizam os filtros ou membranas de alta seletividade. Reposição de cálcio intravenoso pode ser utilizada prevenindo assim essa complicação (McLeod 2010; Morales 2011). Gordon et al. (1986b) descreveram que o citrato de sódio, utilizado como anticoagulante em procedimentos de leucoaférese, pode causar alterações nas concentrações séricas de cálcio total e ionizado. Esses autores atribuíram a fasciculação muscular, principalmente em região de membros pélvicos, em dois indivíduos de um grupo de dez, a esse anticoagulante quando esses cavalos foram submetidos ao sequestro de leucócitos por mecanismo de fluxo contínuo.

Outros problemas relacionados à aférese, de uma maneira geral, estão incluídos a hipotensão, reações anafiláticas, tendências a sangramentos, hipotermia e infecções pós plasmaféreses. Todas elas são referenciadas as aféreses que envolvem plasmaférese e troca de plasma e estão relacionadas com a redução do volume circulante que ocorre pela baixa reposição de líquidos e componentes plasmáticos (Moura et al., 2001; Fedez-Lomana, 2012). Nenhuma dessas anormalidades foram percebidas nos exames clínicos trans e pós-aférese dessa pesquisa.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, confirma-se a hipótese de que a leucoaférese de fluxo contínuo é um procedimento seguro e eficaz em reduzir a presença de células inflamatórias circulantes em equinos submetidos a um protocolo de sepse.

6. REFERÊNCIAS

- ALLEN, D. Overview of the Pathogenesis of Laminitis - Models and Theories. *AAEP Equine Laminitis Research Meeting and Panel, 2004*; Louisville, KY; 2004, p. 5-19.
- BAILEY, S. R.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *The Vet J.* v. 167, p. 129-142, 2004.
- BAILEY, S R.; ADAIR, H. S.; REINEMEYER, C. R. et al. Plasma concentrations of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose laminitis. *Vet immunol immunopathol.* v. 15, n. 129, p. 167 – 173, 2008.
- BELKNAP, J.K. Black walnut extract: an inflammatory model. *Vet Clin North Am Equine Pract.* v. 26, n.1, p. 95-101, 2010.
- BERNARDO, O. J.; ESCODRO, P. B.; ROVERI, E. G.; ESCODRO, L. O.; OLIVEIRA, C. F.; FONSECA, L. S.; Automated plasmapheresis in horses: report of two cases. *ARS Veterinária.* v.28, n.3, 148-152, 2012.
- BLUM, W.; PORCU, P. Therapeutic apheresis in hyperleukocytosis and hyperviscosity syndrome. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* v. 33, n.4, p350 - 354 2007.
- EADES, S.C. Overview of Current Laminitis Research. *Vet Clin Equine.* v. 26, p. 51-63, 2010.
- ESCODRO, P. B.; BERNARDO, O. J.; ESCODRO, L. O.; ROVERI, E. G.; FONSECA, L. S.; NASCIMENTO, T. G. Plasmaférese automatizada em equino: relato de procedimento. *R. bras. Ci. Vet.* v. 19, n. 2, p. 74-77, 2012.
- ESCODRO, P.B.; BERNARDO, J.O.; ROVERI, E.G.; ESCODRO, L.O.; OLIVEIRA, C.F. et al. Padronização da técnica de plasmaférese automatizada em equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.4, p.1049-1056, 2013.
- FALEIROS, R. R.; JOHNSON, P. J.; NUOVO, G. J. et al. Lamellar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *J. Vet. Intern., Med.* v. 25, p. 107–115, 2011.
- FDEZ.-LOMANA, F. A. Procedimientos de aféresis terapéutica. In: Manual de aféresis terapéutica basada en la evidencia. Espanha: Barcelona, 2012. p. 15-25.
- FEIGER, K.; EHRAT, F. B.; KASTNES, C. C.; WAMPFLER, B. The effects of automated plasmapheresis on clinical, haematological, biochemical and coagulation variables in horses. *The Vet. J.* v.169, p. 102 – 107, 2005.

FEIGER, K.; EHRAT, F. B.; KASTNES, S. B. R.; SCHWARZWALD, C. C. Automated plasmapheresis compared with other plasma collection methods in horse. *J. Vet. Med.* v. 50, p. 185 – 189, 2003.

FUJIMOTO, E.; FUJIMOTO, N., KURODA, K. et al. Leukocytapheresis treatment for pyoderma gangrenosum. *British J. Dermatology.* v. 151, p 1090 – 1092, 2004.

GORDON, B. J.; LATIMER, K. S.; MURRAY, C. M.; MOORE, J. N. Continuous-flow centrifugation hemapheresis in the horse. *Am. J. Vet. Res.* v.47, n. 2, p. 342- 345, 1986, (a).

GORDON, B. J.; LATIMER, K. S.; MURRAY, C. M.; MOORE, J. N. Evaluation of leukapheresis and thrombocytapheresis in the horse. *Am. J. Vet. Res.* v.47, n. 5, p. 997-1001, 1986, (b).

HASEGAWA, M.; KAWAMURA, N., MURASE, M. et al. Efficacy of granulocytapheresis na leukocytapheresis for the treatment of microscopic polyangiitis. *Therapeutic apheresis and dialysis.* v. 8, n. 3, p 212-216, 2005.

IKEDA, S.; TAKAHASHI, A. H.; SUGA, B. Y. Therapeutic depletion of myeloid lineage leukocytes in patients with generalized pustular psoriasis indicates a major role for neutrophils in the immunopathogenesis of psoriasis. *Journ. Am. Acad. Dermatol.* v. 68, n. 4, p. 609- 617, 2013.

LEWIS, S., M.; KHAN, N.; BEALE, R. et al. Depletion of blood neutrophils from patients with sepsis: treatment for the future? *International immunopharmacology.* v. 13, p. 1226-1232, 2013.

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, 2012. 51F. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

McLEOD, B. C. Therapeutic apheresis: history, clinical application, and lingering uncertainties. *Transfusion.* v. 50, p. 1413-1426, 2010.

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

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

MORALES, L. J. M. Aféresis terapéutica en pediatria. *Rev. Mex. Med. Tran.* v. 4, nº 2, p. 62-69, 2011.

MOURA, H. V.; POMERANTZEFF, P. M. A.; GOMES, W. J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* v. 16, p. 376-387, 2001.

NOSCHKA, E.; VANDENPLAS, M.L.; HURLEY, D.J. et al., Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 15, n. 129, p.242-53, 2009.

PINTO, A. P. S.; SOUZA, P. M. S.; ANDRADE, S. L. Papel da plasmaférese na terapêutica da púrpura trombocitopênica: revisão sistêmica. *Ciências Biológicas da Saúde Fits*, v. 1, n. 2, p. 61-66, 2013.

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

SANTOS, M. A. M. Novas abordagens terapêuticas na colite ulcerosa. 36F, 2011. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina), ICBAS – UP.

TAYLOR, S. A review of equine sepsis. *Equine Vet. Educ.* v.27, n.2, p. 99 – 109, 2015.

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

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

CAPITULO 4 – INFLUÊNCIA DA LEUCOAFÉRESE TERAPÊUTICA NOS PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS DE EQUINOS COM LAMINITE E SEPSE INDUZIDA POR MODELO DE OLIGOFRUTOSE

RESUMO

O presente trabalho objetiva avaliar o efeito da remoção de leucócitos circulantes, por meio de protocolo de leucoaférese, sobre os parâmetros clínicos e hematológicos de equinos com laminite aguda induzida pelo modelo oligofrutose. Foram utilizados 12 equinos, fêmeas, sem raça definida com idade média de $10,5 \pm 5$ anos, pesando 430 ± 35 kg, escore corporal 6 ± 1 (escore de 1 a 9), sem histórico prévio de claudicação e distribuídos em dois grupos de 6 animais cada (controle – CON e tratado - LEUCO). Para a separação dos leucócitos, foi utilizada uma máquina com sistema de aférese por sistema de coleta por fluxo contínuo com duplo acesso venoso. Os animais foram monitorados diariamente no período de sensibilização e nos tempos 6, 12, 18, 24, 36 e 60 horas pós-indução da laminite, seguidos imediatamente pela coleta de sangue. No grupo LEUCO ainda foram realizadas coletas de sangue uma hora após o início do procedimento e após a cada hora até o fim da realização da leucoaférese totalizando quatro coletas. Sinais de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e de laminite foram observados nos dois grupos, porém, mais brandos no grupo de equinos submetidos ao protocolo de leucoaférese. Concluiu-se que o protocolo utilizando a leucoaférese promoveu redução das contagens sanguíneas de células inflamatórias, reduziu sinais de sepse e preveniu mortalidade por SIRS, em cavalos submetidos à indução experimental de laminite com o modelo de oligofrutose, se mostrando como uma opção terapêutica para laminite séptica.

Palavras chaves: SIRS, sequestro de leucócitos, biópsia de casco, aférese.

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the effect of leukocyte sequestration by automated continuous flow leukapheresis procedures in the clinical hematological parameters of horses with acute laminitis induced by the oligofrutose model. Twelve non-defined equine females with a mean age of 10.5 ± 5 years, weighing 430 ± 35 kg, body score 6 ± 1 (score from 1 to 9), without previous history of claudication related to hooves and divided into Two groups of 06 animals each (control - CON and treated - LEUCO). For the leukocyte separation, a machine, was used by continuous flow collection system with double venous access. The animals were monitored daily during the sensitization period and at 6, 12, 18, 24, 36 and 60 hours after induction of laminitis, followed immediately by blood collection. In the treated group, blood samples were collected one hour after the beginning of the procedure and after each hour until the end of the leukapheresis, totaling four collections. Signs of systemic inflammatory response

syndrome and laminitis were observed in both groups, but much milder in the equine group submitted to the leukapheresis protocol. All clinical and hamatological parameters evaluated were lower or milder in the treated group. The protocol of therapeutic leukapheresis was efficient in reducing clinical signs of SIRS attenuating the evolution to MODS and preventing death in horses subjected to the oligofructose model of sepsis and laminitis.

Keywords: SIRS, sepsis, leukocyte sequestration, apheresis.

1. INTRODUÇÃO

A laminite é uma afecção muitas vezes frustrante para os veterinários de equinos, uma vez que o conhecimento e a compreensão da fisiopatologia na progressão da doença ainda são incompletos (Belknap et al., 2009; Belknap, 2010; Eades, 2010, a; Eades, 2010, b; Leise et al., 2011; Katz e Bailey, 2012; Tadros et al., 2013), limitando os esforços para prevenir e tratar esta doença devastadora (Eades, 2010, a; Katz e Bailey, 2012; Tadros et al., 2013). No entanto, pesquisas científicas vem se desenvolvendo rapidamente, permitindo cada vez mais, o entendimento sobre os eventos fisiopatológicos envolvidos nessa enfermidade (Eades, 2010, a; Eades, 2010, b).

O desenvolvimento de laminite aguda muitas vezes se dá após outras doenças primárias. Por conseguinte, os mecanismos envolvidos na sua patogênese são numerosos e inter-relacionados. As principais doenças associadas e que normalmente antecedem à laminite aguda incluem endotoxemia, sepse e inflamação sistêmica causada por doença gastrointestinal, pneumonia, metrite séptica, ingestão do extrato da noqueira preta e sobrecarga de carboidratos (Belknap et al., 2009; Belknap, 2010; Eades, 2010, a; Eades, 2010, b; Leise et al., 2011; Katz e Bailey, 2012; Tadros et al., 2013).

Todas essas condições se tornam um foco inflamatório/infeccioso inicial que é capaz de promover a ativação, o recrutamento e o influxo de leucócitos para órgãos distantes (Faleiros et al., 2011, Lima et al., 2016). O recrutamento de neutrófilos ao tecido inflamado é uma parte essencial da resposta imune inata. Dessa maneira, leucócitos desempenham um papel central na injúria tecidual em várias doenças e estão intimamente relacionados à disfunção orgânica durante a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (Belknap et al., 2009; Laskoski et al. 2016). A ativação sistêmica de leucócitos e a migração dessas células para o interstício têm sido demonstradas nas lâminas do casco e em outros órgãos de cavalos durante a fase de desenvolvimento da laminite (Black et al., 2006, Faleiros et al., 2008). Assim, o fluxo de leucócitos aos tecidos tem se tornado importante foco de estudo da terapêutica da laminite em equinos (Lima et al., 2016).

Um método que vem sendo utilizado para controlar a inflamação mediada por leucócitos na medicina é a aférese terapêutica. O termo férese é derivado do grego e

significa "remover uma parte de seu todo". Aférese é um termo geral para remoção de plasma (plasmaférese) ou células (citaférese). Foi utilizada pela primeira vez, em 1914, em experiências com animais para obter antissoros (Medina-Macías, 2005; Morales, 2011).

Aférese, como uma modalidade terapêutica (AFT), tem como principal fundamento filtrar o sangue do paciente através de um dispositivo extracorpóreo, com finalidade de eliminar patógenos que condicionam ou perpetuam uma doença e assim, contribuir para o tratamento (McLeod, 2010; Morales, 2011; Fdez-Lomana, 2012). Atualmente na medicina a aférese é realizada por aparelhos de fluxo contínuo, onde o sangue de um doador é filtrado ou separado através de centrifugação, separando a fração desejada do sangue (McLeod, 2010). De acordo com o componente removido, a aférese pode ser classificada em plasmaférese (remoção de plasma), leucaférese (remoção leucócitos), eritrocitaférese (remoção de eritrócitos) e plaquetaférese (remoção de plaquetas) (Pinto, 2013).

As indicações da AFT são inúmeras, todas com suas justificativas específicas para determinada doença ou procedimento cirúrgico. Dentre suas indicações em humanos podemos citar as doenças cardiológicas; (McLeod 2010), da pele; (Medina-Macías, 2005; Pinto, 2013), digestivas, hematológicas (Medina-Macías, 2005; McLeod 2010; Fedez-Lomana 2012; Pinto, 2013) doenças reumáticas; (McLeod 2010; Fedez-Lomana 2012), doenças neurológicas, renais e vasculares (McLeod 2010).

Na medicina veterinária procedimentos aferéticos, como a plasmaférese, são amplamente utilizados para a produção de antissoros ou soros hiperimunes, entretanto, raros estudos foram descritos de procedimentos de leucoaférese para tratamentos de afecções o que abriria um leque de opções terapêuticas inovadoras para os animais domésticos.

A hipótese desse trabalho é que o protocolo terapêutico de leucoaférese automatizada por fluxo contínuo é eficiente para reduzir o número de leucócitos circulantes de equinos com laminite induzida pelo modelo de oligofrutose e conseqüentemente minimizar os sinais clínicos e hematológicos induzidos por esse modelo experimental. Dessa forma o objetivo foi avaliar o efeito do sequestro dos leucócitos, através de procedimentos de leucoaférese automatizada por fluxo contínuo, nos parâmetros clínicos hematológicos de equinos com laminite aguda induzida pelo modelo de oligofrutose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia experimental foi aprovada pelo Comitê de Ética Sobre Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG 281/2013). Foram utilizados doze equinos, fêmeas, sem raça definida com idade média de $10,5 \pm 5$ anos, pesando 430 ± 35 kg, escore corporal 6 ± 1 (escore de 1 a 9), sem histórico prévio de claudicação, prenhes negativa,

previamente adaptadas por uma semana ao confinamento em baia e a uma dieta exclusiva à base de feno de gramínea (*Cynodum sp*). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, controle (n=6) e tratado (n=6) e permaneceram instalados no setor de Cirurgia de Grandes Animais da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a pesquisa ocorreu nos meses entre junho e julho.

2.1. INDUÇÃO DA LAMINITE

Setenta e duas horas antecedendo a indução (T-72), todos os animais receberam 1g/kg de peso vivo de oligofrutose (Raftilose P95 – Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda), diluídos em 3 litros de água, via sonda nasogástrica, que foi repetido durante mais dois dias (T-48 e T-24), sendo esses considerados período de sensibilização. No quarto dia (T0), todos os animais receberam 10g/kg pela mesma via com o mesmo volume, procedimento considerado como indução da laminite (adaptado de Van Eps e Pollit, 2006; Lima et al., 2013, Lima et al., 2016).

2.2. GRUPO TRATADO – LEUCOAFÉRESE (LEUCO)

Doze horas após a indução, os equinos foram contidos em tronco e, no intuito de minimizar o desconforto durante o período do procedimento, foi realizada a sedação com cloridrato de detomidina (Dormium, Agener União) na dose de 20 µg/kg, IV. Em seguida ambas as jugulares foram canuladas com cateteres 14 G (Teflon-Entfe). Para a separação dos leucócitos, foi utilizada uma máquina com sistema de aférese Cobe Spectra (Terumo BCT, Lakewood USA), com kit comercial Terumo BCT WBC por sistema de coleta por fluxo contínuo com duplo acesso venoso. Nos primeiros 1000 ml de sangue processados não foi realizada a coleta, permitindo o ajuste da camada leucocitária (*buffy coat*). A separação dos leucócitos foi feita por meio de centrifugação (765 RPM), com fator de separação 500, até serem processados uma média de 16628,1 ml (\pm 1300ml) de sangue (a taxa de retirada foi de 75 ml por minuto). Ainda, para facilitar a separação de leucócitos foi administrada, pela via de infusão, solução hidroxetilamido - HES (\pm 966,67 ml).

Para evitar coagulação do sangue presente no sistema e no momento da reinfusão, foi associado o anticoagulante citrato dextrose (taxa de infusão de 4ml/min). Os leucócitos foram acondicionados em bolsa de transfusão de sangue de 500 ml (Figura 1). Os demais hemocomponentes foram reinfundidos (jugular esquerda) no animal em fluxo contínuo, simultaneamente à separação dos leucócitos sem contaminação ou manipulação direta do sangue. Como medida de segurança, se algum animal apresentasse sinais de MODS com grave deterioração orgânica e como forma de impedir o extremo sofrimento a eutanásia foi realizada.

Imediatamente após a realização da leucoaférese, todos os animais desse grupo foram sondados com uma sonda nasogástrica de 11mm para administração de fluido enteral constituído de 80,55g de cloreto de sódio (NaCl), mais 5,55g de cloreto de potássio (KCl) e 56,7g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) diluídos em 15 litros de água na dose de 3 ml/kg/hora. Esta terapia durou um período de 12 horas.

2.3 EXAME CLÍNICO E COLETAS DE SANGUE

Os animais foram monitorados diariamente no período de sensibilização e nos tempos 6, 12, 18, 24, 36 e 60 horas pós-indução da laminite (T0 a T60), seguidos imediatamente pela coleta de sangue. No grupo tratado ainda foram realizadas coletas de sangue uma hora após o início do procedimento e após a cada hora até o fim da realização da leucoaférese totalizando quatro coletas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, coloração de membranas mucosas, presença e intensidade de pulso digital, presença e intensidade dos sons intestinais, sensibilidade ao exame com pinça de casco e grau de claudicação segundo Obel (1948) seguindo metodologia descrita por Lima et al., (2013).

Amostras de sangue foram coletadas pela punção da veia jugular, acondicionadas em 3 tubos distintos (sem anticoagulante, com ácido etileno-diamino-tetracético e com fluoreto de sódio) e refrigeradas imediatamente até a realização de hemograma e separação de soro e plasma. As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas por 5 min, a 3000G até completar a separação da fração líquida (soro) que foi armazenada em freezer a -18°C. Além do hemograma, foram determinadas as concentrações plasmáticas de glicose, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total e proteínas. Para determinação do volume globular (VG) foi utilizada a técnica de micro-hematócrito com centrifugação durante 5 min a 10000 rpm. A concentração de proteína plasmática total foi determinada por refratometria. A contagem das células sanguíneas foi realizada em aparelho automático através da técnica de impedância elétrica (Abacus Junior Vet). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com panótico, avaliando-se 100 células. Para mensuração da glicemia foram utilizadas amostras de plasma em fluoreto, obtidas após centrifugação durante 6 min a 10000rpm. Todas as análises bioquímicas foram realizadas em aparelho espectrofotométrico automático (Cobas-Mira Plus – Roche Diagnostics Systems) utilizando kits comerciais específicos (Kovalent).

Os dados foram analisados pelo programa Prism 5 for Windows 5.00 utilizando o teste de normalidade KS e análise de variância em blocos ao acaso, seguido do teste de Student Newman Keuls para comparação de médias dentro de grupos. Para comparação de grupos dentro dos tempos, utilizou-se o teste t de Student. Para todos os testes, considerando-se um nível de significância de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Não se verificou qualquer alteração digna de nota nos exames físicos e laboratoriais em todos os animais de ambos os grupos no período de sensibilização. Todavia, tais alterações começaram a ser perceptíveis 12 horas (T12) após a indução com a dose completa de oligofrutose (10g/kg).

Diarreia foi um sinal clínico presente em todos os animais e teve início em T12, com duração até o fim do experimento. Essa foi mais intensa em CON, principalmente no período que variou entre T18 e T24. Todos os animais em ambos os grupos apresentaram motilidade intestinal elevada com início também em T12, atingindo maior intensidade no T24 no grupo controle e no T36 no grupo tratado.

No CON, a congestão de mucosa foi presente em todos os animais em T24 e se manteve até T36. No LEUCO a congestão também foi vista em T24. Porém, em T36 esse parâmetro foi mais discreto e em T60 (final do experimento) essa já não era mais visualizada.

Quatro animais do CON adotaram posição de decúbito em T24, no T36 todos os animais estavam nessa posição nesse grupo, sendo que dois foram a óbito naturalmente e os outros foram eutanasiados. No LEUCO três animais adotaram a posição de decúbito entre T24, mas em T36 já se encontravam em estação. Um animal desse grupo adotou posição de decúbito em T36, mas já estava em posição quadrupedal antes de T48. O resultado da claudicação segundo a classificação de Obel não revelou diferença estatística entre os grupos, porém, no grupo LEUCO, as classificações se mantiveram estáveis (Tabela 01).

Os resultados para FC, FR, TR e TPC estão representados na Figura 1. No CON, observou-se aumento de FC, TPC e TR em relação ao T0 em T18 e T24. Já no LEUCO, esse aumento ocorreu somente em T48 e T60 para FC, em T48 para TR e a partir de T24 para TPC.

Os resultados para RBC, FIB, PLT e GLI estão representados na Figura 2. No CON, observou-se aumento em T24 de RBC, PLT e GLI em relação ao T0. Já no LEU, esse tipo aumento ocorreu somente em T36 para GLI. Observou-se diferença entre grupos nos tempos T24 para FIB e T12, T18 e T24 para ALB.

Os resultados para VG, PT, ALB e GLB estão representados na Figura 3. No CON, observou-se aumento do VG e ALB em relação ao T0 em T18 e 24 e PT e GLB em relação ao T0 em T24. Já no LEUCO, esse tipo aumento não foi observado.

Os resultados para as contagens sanguíneas de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos estão representados na Figura 4. No CON, observou-se elevação dos leucócitos T24 em relação ao T0 e elevação dos segmentados em relação ao T0 e T18 e T24. Já no LEU, foram observadas redução das contagens de segmentados em linfócitos

em relação ao T0 e T48 e T60. Diferenças entre grupos foram verificadas em T6 (leucócitos e linfócitos) e T24 (leucócitos).

Os resultados para BIL T, BIL I, BIL D e AST, estão representados na Figura 5. No CON, observou-se elevação de BIL T e da AST em relação ao T0 em T18 e T24. Já no LEU houve aumento da BIL T e BIL I em relação a T0 em T48 e T60. Diferenças entre grupos foram observadas em T6 (FA), T12 (FA, BIL T, BIL D e BIL I) e para T18 e T24 (todas BIL).

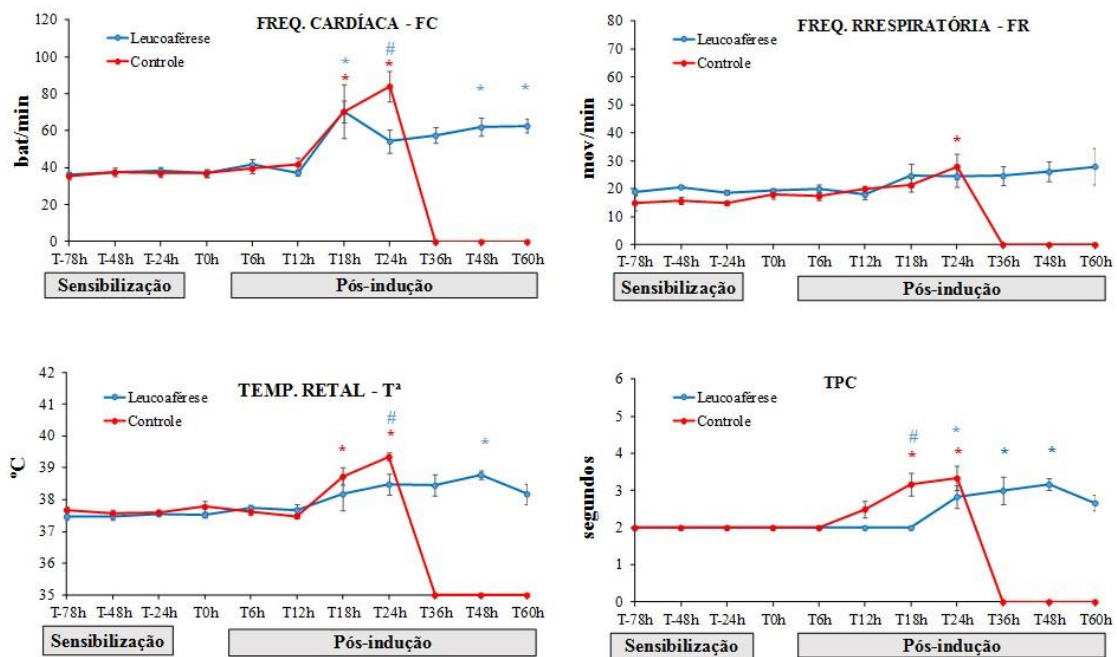


Figura 1: Médias e erros-padrão da contagem de frequência cardíaca (FC), temperatura retal (T^a), frequência respiratória (FR) e tempo de preenchimento capilar (TPC) dos equinos com laminite induzida por oligofrutose tratados (Leucoaférese) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo.

Os resultados para AST, CRE e URE estão representados na Figura 6. Não se observaram alterações em relação ao TO em ambos os grupos. Contudo, houve diferenças entre grupos em T6 (URE), T12 (URE, CRE) e para T18 e T24(CRE).

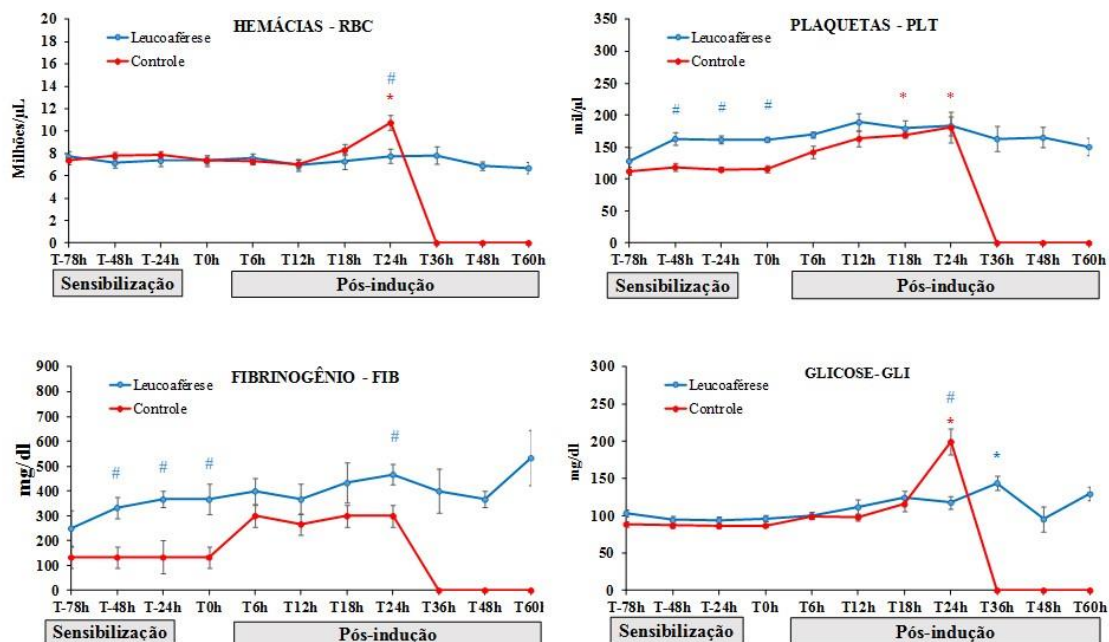


Figura 2: Médias e erros-padrão da contagem de hemácias (RBC), fibrinogênio (FIB), glicose (GLI) e plaquetas (PLT) dos equinos com laminite induzida por oligofruktose tratados (Leuco) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo.

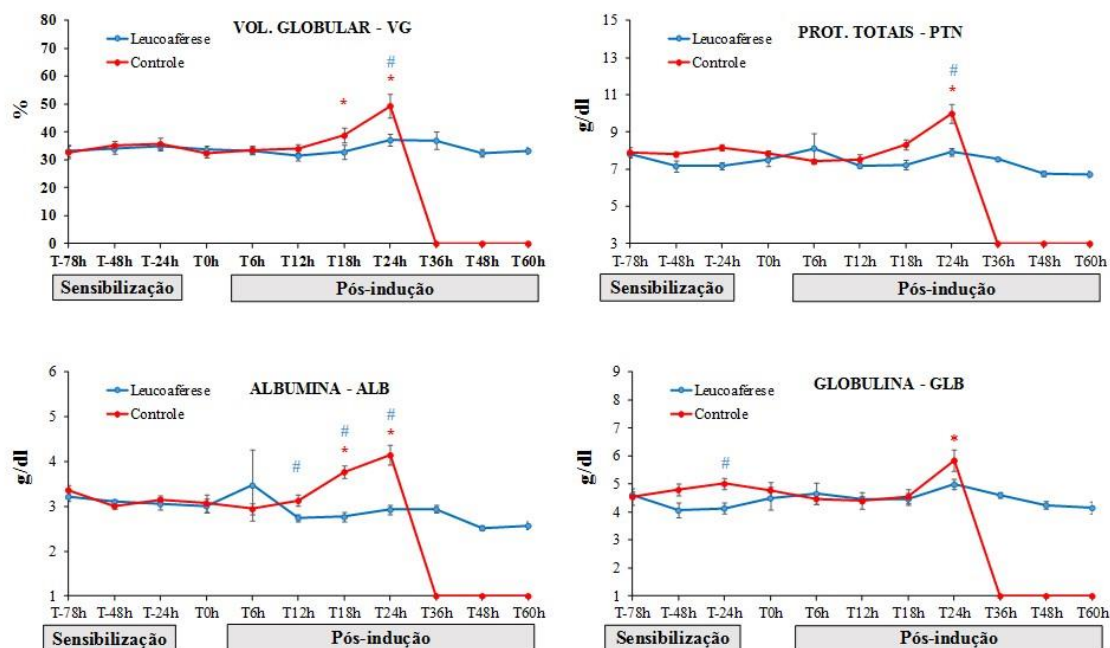


Figura 3: Médias e erros-padrão do volume globular (VG), da albumina (ALB) das proteínas totais (PTN) e das globulinas (GLB) dos equinos com laminite induzida por oligofruktose tratados (Leuco) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo.

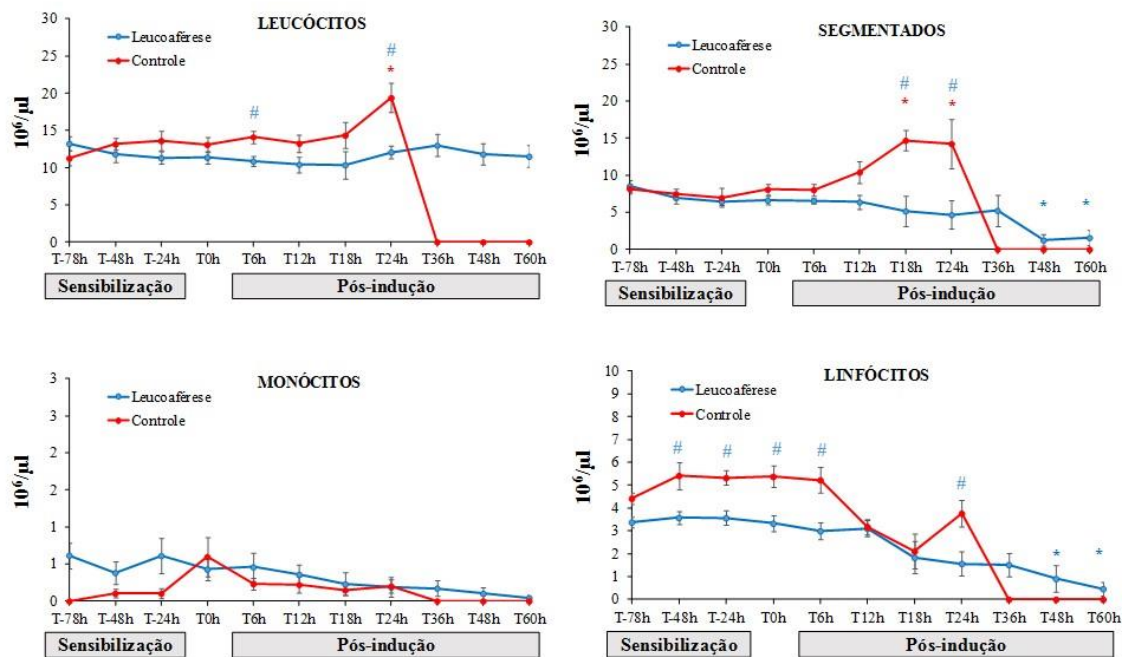


Figura 4: Médias e erros-padrão da contagem de leucócitos, monócitos, segmentados e linfócitos dos equinos com laminite induzida por oligofruktose tratados (Leuco) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo.

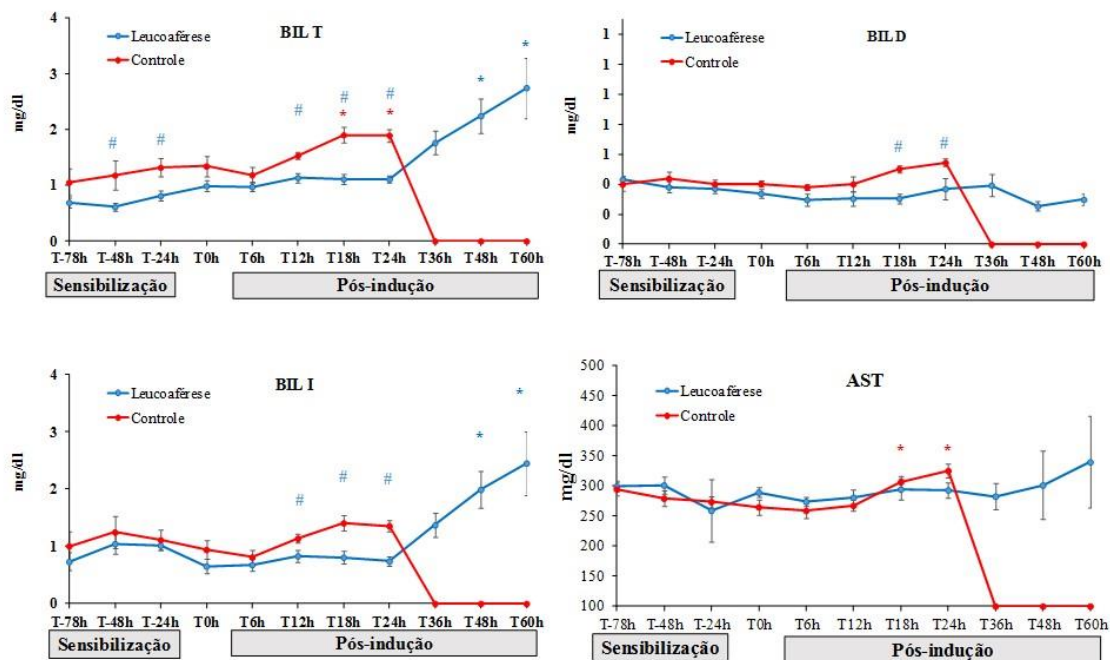


Figura 5: Médias e erros-padrão da bilirrubina total (BIL T), da bilirrubina indireta (BIL I), da bilirrubina direta (BIL D) e da aspartato aminotransferase (AST) dos equinos com laminite induzida por oligofruktose tratados (Leuco) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo.

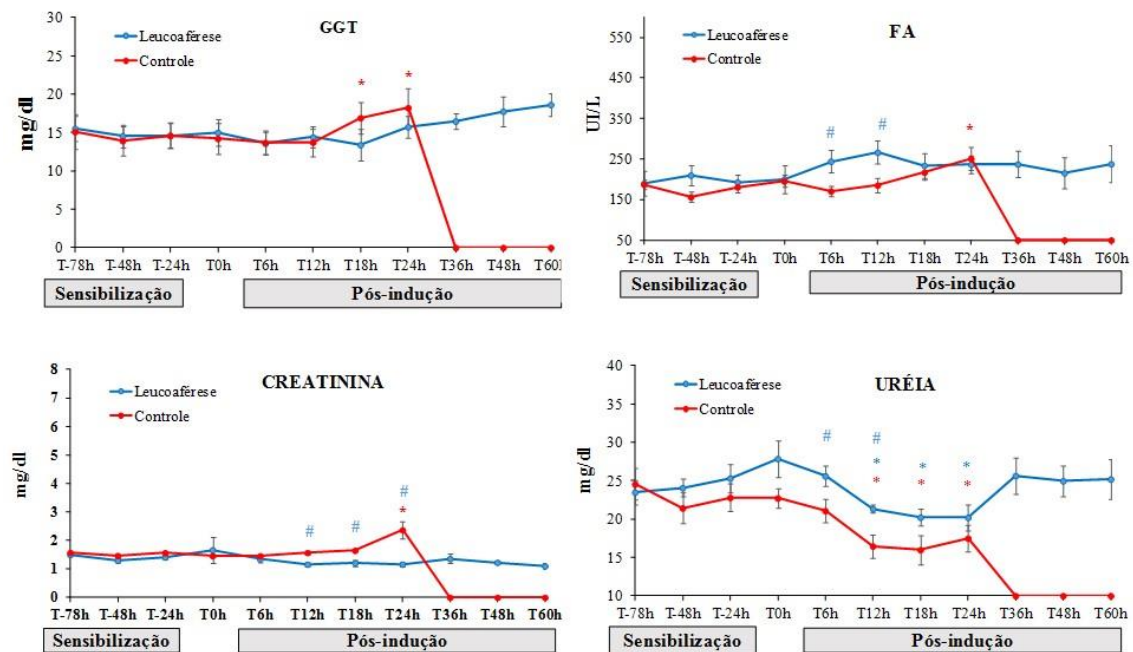


Figura 6: Médias e erros-padrão da contagem de gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), creatinina e uréia dos equinos com laminite induzida por oligofrutose tratados (Leuco) e não tratados (Controle) com leucoaférese. Médias seguidas de (*) diferem entre o tempo T0 no mesmo grupo e as seguidas de asterisco (#) diferem entre grupo no mesmo tempo.

Tabela 1: Resultado dos animais referentes à claudicação segundo a classificação de Obel e o teste de sensibilidade com a pinça de casco.

CON		GRAUS DE OBEL					SENSIB. DA PINÇA DE CASCO					
Anim	T0	T18	T24	T36	T48	T60	T0	T18	T24	T36	T48	T60
1	0	1	2				NEG	NEG	NEG			
2	0	1	1				NEG	NEG	POS			
3	0	0	2				NEG	POS	POS			
4	0	0	2				NEG	NEG	NEG			
5	0	1	1				NEG	NEG	POS			
6	0	1	1				NEG	NEG	NEG			

LEU		GRAUS DE OBEL					SENSIB. DA PINÇA DE CASCO					
Anim	T0	T18	T24	T36	T48	T60	T0	T18	T24	T36	T48	T60
1	0	1	2	2	2	2	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
2	0	0	1	1	1	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	0	1	2	2	2	2	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
4	0	0	1	1	1	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
5	0	1	2	2	2	2	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG
6	0	1	1	2	2	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

CON, grupo controle; LEU, grupo leucoaférese; SENSIB., sensibilidade; NEG, negativo; POS, positivo; T0, tempo zero; T12, tempos doze horas; T18, tempo dezoito horas; T24 tempo vinte e quatro horas; T36 tempo trinta e seis horas; T48 tempo quarenta e oito horas; T60, tempo sessenta horas; Anim, animal.

4. DISCUSSÃO

Em ambos os grupos, a administração de oligofrutose promoveu, além da diarreia, um quadro de taquicardia, congestão de mucosas, aumento do tempo de preenchimento

capilar e hipertemia. Tais sinais são compatíveis com um quadro normalmente denominado como endotoxemia na literatura equina, mas que modernamente tem sido denominado como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (Taylor, 2015).

O termo síndrome da resposta inflamatória sistêmica é usado para descrever inflamação sistêmica que pode ser causada por agentes infecciosos (por exemplo, bactérias, fungos e vírus) ou causas não infecciosas (por exemplo, trauma, queimaduras, pancreatite) (Taylor, 2015). No presente estudo, a administração de oligofrutose por sonda foi a responsável pelo desenvolvimento deste quadro. A ação desse carboidrato solúvel sobre a microbiota intestinal dos equinos está muito bem documentada. Por não ter enzima específica para sua digestão no intestino delgado, a oligofrutose chega inalterada ao intestino grosso, produzindo rápida proliferação de várias espécies de estreptococos e outras cepas de bactérias. A consequência é a produção de grandes quantidades de ácido láctico que reduzem o pH cecal normal (pH de 6,2 a 6,8) para níveis inferiores a pH 5 e causam a lise de bactérias gram-negativas (Milinovich et al., 2006; Milinovich et al., 2010).

Acredita-se que a principal repercussão da alteração da microbiota cecal seja a absorção de toxinas bacterianas, modernamente denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os lipopolissacarídeos (LPS) resultantes da morte das gram-negativas (endotoxinas), associados aos peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, aminas vasoativas e exotoxinas liberados devido à rápida proliferação de gram-positivas, seriam os principais PAMPs a serem absorvidos pela mucosa cecal, chegando à corrente sanguínea (Visser e Pollitt, 2011). Picos nas concentrações plasmáticas de LPS seguidos de picos do fator de necrose tumoral (TNF- α) têm sido descritos respectivamente 8h e 12/24h após a administração dessa mesma dose de oligofrutose em equinos (Bailey et al., 2009). Tais achados explicam o quadro SIRS iniciado pela infecção intestinal verificado no presente estudo. Os achados do presente estudo associados à caracterização da microbiota envolvida na infecção intestinal (Milinovich et al., 2006; Milinovich et al., 2010) e a detecção de toxinas bacterianas circulantes (Bailey et al., 2009; Visser e Pollitt, 2011) demonstram que a administração oral de oligofrutose, além de induzir laminitite, é um modelo consistente para indução de sepse.

Comparando-se os resultados das variáveis clínicas e laboratoriais, fica clara a diferença entre grupos. Nos animais não tratados foram observados sinais evidentes de letargia, depressão, anorexia, decúbito e presença de halo toxêmico. Além disso, a maioria das alterações foram exclusivas do grupo controle como taquipneia, leucocitose, hemoconcentração e aumentos nas concentrações plasmáticas de glicose, creatinina e enzimas hepáticas. Com exceção da taquicardia e das alterações das concentrações plasmáticas de ureia, todas as outras alterações aconteceram de forma mais precoce nos animais não tratados. Uma complicação frequente da SIRS/sepse é o desenvolvimento de alterações em diversos órgãos, quadro conhecido como síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), quando mais de dois órgãos apresentam sinais de funcionamento alterado (Taylor, 2015). Este quadro é bem condizente com o verificado

nos animais do grupo controle, pela elevação das concentrações sanguíneas de AST, GGT, FA e bilirrubina total, indicando distúrbio hepático, da creatinina, indicando distúrbio renal, e da glicose, indicando agressão pancreática e metabólica.

Diversos autores descrevem que há uma íntima relação da SIRS/sepse, SDMO e a laminite (Belknap et al., 2009, Faleiros et al., 2011; Lima et al., 2013; Faleiros & Belknap 2017). Isso se dá pelo influxo de leucócitos da circulação sistêmica para o casco como também a ativação de células inflamatórias residentes por mediadores inflamatórios liberados nessas duas síndromes. Desta forma, justifica-se o uso da leucoaférese na tentativa de amenizar os sinais clínicos dessas síndromes bem como atenuar os sinais clínicos de laminite.

Entretanto a diferença mais marcante entre grupos foi à taxa de óbito. Nenhum dos animais do grupo controle sobreviveu, apresentando quadro de choque séptico em T36, enquanto que todos os tratados concluíram o período experimental. Em T18 houve aumento na FC em ambos os grupos, contudo se mantendo elevada apenas no grupo controle. Já a FR aumentou apenas no CON (T30). A TR se manteve elevada de T18 a T30 nesse mesmo grupo, atingindo seu máximo em T24 (39,4°C), diferindo estatisticamente do LEUCO nesse momento. No grupo de animais submetidos a leucoaférese o aumento de TR ocorreu apenas em T36, quando alcançou seu máximo (38,8°C).

Outro sinal clínico em ambos os grupos, e também citado por Lima et al., (2013), foi a presença de diarreia em todos os animais, iniciando em T12 e predominando entre T24 e T 36 nos dois grupos com intensidade maior no grupo controle. Estes mesmos autores, relatam que a duração da diarreia foi até 48 horas após a indução da laminite e que foi um período maior que a observada no grupo de animais recebendo a mesma quantidade de oligofrutose (10g/kg) descrita por Van Eps e Pollitt (2006). O influxo osmótico de água para o lume intestinal associado ao desequilíbrio da microbiota pela alteração do pH, ambos provocados pela chegada abrupta de grandes quantidades de oligossacarídeos ao ceco e cólon, pode explicar o quadro de diarreia intensa (Milinovich et al., 2006; Van Eps e Pollitt 2006; Milinovich et al., 2010; Lima et al., 2013). O aumento da motilidade intestinal no mesmo período da diarreia indica o aumento da taxa de passagem da ingesta e certamente o aparecimento de espasmos e o desconforto abdominal. Nesse sentido, o aumento da frequência cardíaca coincidiu com o período de diarreia, podendo ser causada pelo desconforto (Lima et al., 2013).

Outras pesquisas também usaram estratégias para reduzir o influxo de neutrófilos para os tecidos lamelares de equinos com laminite induzida por modelo de oligofrutose, só que de forma farmacológica com o uso de um antagonista de quimiocinas (Lima et al., 2013). Nesse estudo, os autores observaram o início do surgimento dos sinais clínicos a partir de 12 horas após o período de indução da laminite, com o pico dos sinais acontecendo em 24 horas após a indução, esse achado também foi descrito por Van eps e Pollitt (2006). Aumento da FC, da FR e da TR também foram observadas, porém se

comportaram diferentes entre os grupos. No CON houve elevação no T24 e esses parâmetros decaíram acentuadamente em T36 o que coincidiu com o óbito e a eutanásia dos animais desse grupo. Já no LEUCO após a elevação houve aumento da FC em T24 e da TR em T48. Esses achados vão ao encontro do que foram descritos por diversos autores (Peiró et al., 2002; Gravena, 2010; Taylor, 2015) sobre essa MODS onde a resposta inflamatória sistêmica do organismo à invasão microbiana pode causar deterioração rápida do organismo.

A presença de pulso evidente nas artérias digitais e de sinais de claudicação grau 1 de Obel foram observados no CON e LEUCO a partir do T18, esses resultados são semelhantes ao observado no trabalho de Van Eps e Pollitt (2006) e Lima et al., (2013). Grau 2 de Obel também foram observados nos dois grupos no T24, porém no T36 os animais do grupo CON estavam em decúbito e por isso não foram avaliados para tais parâmetros nesse tempo. Já no LEUCO esses achados se mantiveram até o final do experimento. Nenhum dos animais dessa pesquisa atingiram grau de Obel 3 e assim são inferiores aos resultados descritos por Van Eps e Pollitt (2006), Paes Leme et al., (2010) e Lima et al., (2013) que encontraram esse grau de claudicação.

Lima et al., (2013) justificaram a manutenção do grau de claudicação Obel 1 e 2 e não evolução para graus maiores de claudicação em seu estudo pelo peso dos animais que era inferior ao peso dos utilizados por Van Eps e Pollitt (2006), porém, o presente trabalho, utilizou animais com peso médio de 430 kg que são bem próximo ao utilizado por esses últimos autores e ainda receberam oligofrutose no período pré-sensibilização. Esse pode ser mais um fato que mostra a eficiência da leucoaférese em atenuar lesões sistêmicas e lamelares nos equinos que foram submetidos a esse procedimento.

Outra justificativa muito plausível foi a levantada por Lima et al., (2013) para a menor manifestação clínica de dor com o teste da pinça de casco e ao grau de Obel, que seria a características dos animais. Isso por que os animais brasileiros poderem apresentar um fenótipo metabólico diferente de outra raça internacional previamente estudada e dessa forma reagirem de forma mais branda a um desafio semelhante com oligofrutose.

Cinco animais do CON foram a decúbito no período entre 18 e 24 horas após indução. O mesmo ocorreu com 4 animais no LEUCO no período entre 18 e 30 horas. Esse achado clínico também foi descrito por outros autores (Van Eps e Pollitt 2006; Lima et al., 2013) que induziram laminite em equinos com o modelo de oligofrutose. Tal posição talvez seja justificada, nos dois grupos, pela febre, anorexia e apatia causada pela SIRS (Taylor 2015). É válido salientar que nenhum animal dos dois grupos testados aqui revelou sinal de dor abdominal característico de síndrome cólica, porém, o período em que a diarreia foi mais evidente pode ter coincido com o acontecimento de espasmos intestinais e que também podem justificar a posição de decúbito, fato que corrobora com o que foi descrito por Lima et al., (2013).

Os animais CON mostraram sinais de SIRS/seps (taquicardia, taquipnéia, hipertermia que progrediu para hipotermia e leucocitose) no período de 36 horas. Essa condição evoluiu para um quadro de choque séptico, que causou óbito de todos eles. Na literatura

consultada, nenhum outro trabalho científico com laminite usando o modelo de oligofrutose revelou óbitos dos animais, porém Van Eps e Pollitt, (2006) usaram a eutanásia no grupo de equinos utilizados no seu experimento no tempo 48 horas após a indução da laminite. Quando comparamos também o tempo de estudo de equinos submetidos ao protocolo de laminite com oligofrutose nenhum estudo acompanhou até o tempo 60 horas após a indução da laminite, todos os trabalhos acompanharam os equinos por tempo inferior.

No LEUCO, o protocolo de leucoaférese foi eficiente para atenuar os efeitos sistêmicos e hemodinâmicos do quadro de SIRS, de diarreia, de desidratação, apatia e evitou os óbitos dos animais desse grupo. Em um estudo com SIRS em camundongos induzidas com a administração de LPS e tratados por dois diferentes modelos de filtração de leucócitos seis horas após a indução, os autores conseguiram reduzir a contagem de leucócitos em até 90 % (Hagiwara et al. 2011). Tais pesquisadores revelam uma taxa de sobrevivência de 53% no grupo com filtração baixa e de 80% no grupo com alta taxa de filtração de leucócitos. Quando comparados, os dois grupos camundongos tratados com o grupo controle, lesões em pulmão e fígado foram acentuadamente menores no tratado. Os autores justificaram esse achado pela redução da contagem de leucócitos circulantes juntamente com a redução dos mediadores inflamatórios (Hagiwara et al. 2011). Tais achados estão em consonância com o presente estudo e são indicativos de que o mesmo ocorreu com os equinos do grupo LEUCO.

Num modelo de endotoxemia induzida em 24 cães tratados ou não com leucoaférese num circuito de fluxo contínuo (Zhi-Gao He et al., 2012), as injúrias em órgãos causadas pela resposta inflamatória sistêmica, principalmente pulmão, foram atenuadas com o tratamento. Nesse estudo observou-se redução de contagem de células apoptóticas, infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar, quantidade de secreção no alvéolo nos grupos tratados. Os autores afirmaram que os leucócitos, principalmente os neutrófilos, quando ativados na sepse liberam proteases e espécies reativas de oxigênio que são capazes de degradar elementos estruturais fundamentais, como proteoglicanos e membrana basal, presentes no tecido conjuntivo, endotelial e em células epiteliais do pulmão e outros órgãos e essa seria a explicação para os melhores resultados no grupo tratado do seu experimento (Zhi-Gao He et al., 2012). Esta seria uma explicação plausível para justificar os resultados melhores no grupo LEUCO deste estudo.

Como afirmado anteriormente, a fermentação no lúmen intestinal com queda do pH e a lesão das mucosas induzidas com a presença da oligofrutose permitem a absorção de PAMPs, que estimulam a produção ou o aumento de leucócitos (Milinovich et al., 2006, Belknap, 2010). Lima et al., (2013) justificaram o aparecimento de leucocitose no tempo 48 horas na sua pesquisa. No grupo controle dessa pesquisa, os leucócitos tiveram elevação no tempo 12 horas após a indução com uma queda no período 24 horas e novo aumento no tempo 36. Esse comportamento dos leucócitos sistêmicos também foi descrito por Zhi-Gao He et al. (2012) em um modelo de sepse em cães.

Já no grupo LEUCO, as células inflamatórias sofreram redução na sua contagem no tempo 16 horas e mantiveram em queda até o final do experimento. Embora os animais desenvolvessem sinais sistêmicos compatíveis com SIRS (febre, diarreia e mucosas congestas), uma esperada leucopenia inicial não foi observada. Em geral, sinais graves de SIRS cursam com leucopenia em várias situações clínicas assim como na laminite induzida pelo fornecimento de extrato de noqueira preta (*Juglans nigra*). Contudo, leucopenia não tem sido observada em cavalos submetidos à sobrecarga com carboidratos (Faleiros et al., 2011, Lima et al., 2013).

Interessante observar que ao final do período experimental (T48 e T60), houve alteração de algumas variáveis no LEUCO, como aumentos na FC, TR, TPC, concentrações de bilirrubina indireta e total e redução nas contagens de segmentados e linfócitos, demonstrando deterioração do quadro clínico desses animais. De fato, após o período experimental de 60 horas, três animais do grupo LEUCO apresentaram recorrência do quadro inflamatório sistêmico, sendo que um foi a óbito e outros dois precisaram de suporte terapêutico. Esses achados indicam que o protocolo de leucoaférese empregado foi eficiente em atenuar, e retardar os efeitos da SIRS induzida pelo protocolo de oligofrutose utilizado nessa pesquisa.

Deve-se ressaltar que o protocolo de leucoaférese aqui utilizado incluiu algumas medidas terapêuticas que não foram realizadas no grupo controle, como o uso de anticoagulante e hidroxietilamido durante o procedimento e fluidoterapia enteral após. Sendo assim, uma limitação do presente estudo é a dificuldade de se separar os efeitos terapêuticos produzidos pela fluidoterapia dos produzidos pela leucoaférese. Apesar de alguns efeitos observados serem característicos da hidratação como, prevenção do aumento na concentração de proteínas plasmáticas, TPC e VG entre T18 e T24, outros foram atribuídos à redução dos leucócitos como prevenção no aumento das contagens de leucócitos sanguíneos, de hipertemia.

A inclusão da hidroterapia enteral no protocolo ocorreu devido à necessidade de reposição de fluidos ocorrida durante o procedimento de leucoaférese que durou cerca de quatro horas. Uma forma de depurar os efeitos diretos da redução de leucócitos promovida pela leucoaférese seria a inclusão de um grupo sham, com o uso de circulação extracorpórea sem separação de componentes sanguíneos seguida pela mesma hidratação enteral. Contudo tais objetivos estão além dos postulados nesse experimento e necessitariam de recursos muito acima dos disponíveis para este projeto. Dessa forma, considerou-se que a prevenção da evolução do quadro para MODS, conforme ocorrido no grupo controle, ocorreu em função de todo o protocolo que incluiu leucoaférese.

5. CONCLUSÃO

O protocolo de leucoaférese terapêutica é eficiente em amenizar os sinais clínicos de SIRS em equinos submetidos à indução de sepse e laminite pelo modelo de

oligofrutose, prevenindo a evolução de choque séptico e consequente óbito dos equinos tratados.

6. REFERÊNCIAS

BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N.; CROUSER; E.C. Sepsis - from human organ failure to laminar failure. *Vet. Immunol. Immunopatho.* v.129, n. 155 – 157, 2009.

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

BLACK, S. J.; LUNN, D. P.; YIN, C.; HWANG, M. et al. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. *Vet. Immunol. Immunopath.* v.109, p.161 - 166, 2006.

BOTTEON P.T.L.; FERRAZ V.P.; GLÓRIA M.B.A.; MELO M.M. et al. Concentrações plasmáticas de triptamina, tiramina e feniletilamina em equinos sob efeitos de sobrecarga de carboidratos e antiinflamatórios não esteroidais. *Pesq. Vet. Bras.* v. 28, p.299-302, 2008.

EADES, S. C. Overview of current laminitis research. *Vet. Clin. Equine* v. 26, p. 51 - 63, 2010. (a).

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

FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G.; ALVES, G.E.; et al., Local and remote lesions in horses subjected to small colon distension and decompression. *Can. J. Vet. Res.*, v.72, p.68-76, 2008.

FALEIROS R.R., JOHNSON P.J., NUOVO G.J., MESSER N.T. ET AL. Laminar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *J. Vet. Intern., Med.* v. 25, p. 107–115, 2011.

FDEZ.-LOMANA, F. A. Procedimientos de aféresis terapêutica. In: Manual de aféresis terapêutica basada en la evidencia. Espanha: Barcelona, 2012. p. 15-25.

GRAVENA, K. Avaliação da integridade dos tecidos dérmico e epidérmico do casco de equinos colhidos pelo acesso trans-mural dorsal. 2010. 50 f. Dissertação de mestrado, Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

HAGIWARA, S.; IWASAKA, H.; HASEGAWA, A.; HIDAKA, S.; et al. Filtration leukocytapheresis therapy ameliorates lipopolysaccharide induced systemic inflammation in a rat model. *J. Surgical Research.* v. 171, n. 2, p. 777 – 782, 2011.

KATZ, L. M.; BAILEY, S. R. A review of recent advances and current hypotheses on the pathogenesis of acute laminitis. *Equine. Vet. J.*, v. 44, p.752-761, 2012.

LASKOSKI, L. M.; VALADÃO, C. A. A.; DITTRICH R. L. *et al.*, An update on equine laminitis. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.46, n.3, p.547-553, 2016.

LEISE, B. S.; FALEIROS; R. R.; WATTS, S, M.; JOHNSON, P. J. *et al.* Laminar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis. *Equine Vet. J.* v. 43, n. 1, p. 54 – 61, 2011.

LIMA, L. R.; MENDES H. M. F.; MAGALHÃES, J. F.; MARKOWICZ, L. C. *et al.* Avaliação clínica e hematológica de equinos submetidos ao modelo de laminite por ligofruktose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2. *Pesq. Vet. Bras.* v.33, n.8, p. 992-998, 2013.

LIMA, L. R.; MENDES, H. M. F.; SORIANI, F. M. *et al.* Histologic and inflammatory lamellar changes in horses with oligofruktose-induced laminitis treated with a CXCR1/2 antagonist. *Pesq. Vet. Bras.* v.36, n.1, p. 13-18, 2016.

McLEOD, B. C. Therapeutic apheresis: history, clinical application, and lingering uncertainties. *Transfusion.* v. 50, p. 1413-1426, 2010.

MEDINA-MACÍAS, M. Aféresis terapéutica. Recambio plasmático terapéutico. Citaféresis. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* v. 43 (Supl 1), p. 47-52, 2005.

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

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

MORALES, L. J. M. Aféresis terapéutica en pediatria. *Rev. Mex. Med. Tran.* v. 4, nº 2, p. 62-69, 2011.

OBEL, N. (Ed). Studies on the histopathology of acute laminitis. Stockholm: *Vet. Stockholm*, 1948. p.1-50.

PEIRÓ, J. R.; VALADÃO, C. A. A. Endotoxemia em equinos. *Rev. Educ. Contin. CRMV-SP*, v.5, p. 48-58, 2002.

PINTO, A. P. S.; SOUZA, P. M. S.; ANDRADE, S. L. Papel da plasmáférese na terapêutica da púrpura trombocitopênica: revisão sistêmica. *Ciênc. Biol. Saúd. Fits*, v. 1, n. 2, p. 61-66, 2013.

TADROS, E. M.; FRANK, N.; HOROHOV, D. W. Inflammatory cytokine gene expression in blood during the development of oligofructose-induced laminitis in horses. *J. Equine Vet. Science*. v. 33, p. 802-808, 2013.

TAYLOR, S. A review of equine sepsis. *Equine vet. Educ.* v. 27 n. 2, p. 99-109, 2015. doi: 10.1111/eve.12290.

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

ZHI-GAO HE; JIAN HUANG; SHUN-GANG ZHOU; JING HE et al. Peripheral leukocytapheresis attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in vivo. *Mediat. of Inflamm.* v.1, p 1-9, 2012.

CAPÍTULO 5 - EFEITO DA LEUCOAFÉRESE TERAPÊUTICA NA INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA E LESÃO TECIDUAL NO EXTRATO LAMELAR DO CASCO DE EQUINOS SUBMETIDOS A MODELO DE LAMINITE POR OLIGOFRUTOSE

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo identificar a intensidade da infiltração de leucócitos e o grau de dano no tecido laminar do casco de cavalos com laminite aguda induzida por oligofrutose, tratados ou não pela técnica de leucoaférese automatizada. A hipótese é que a leucoaférese será capaz de reduzir a presença de células inflamatórias nas lâminas dérmicas nos cascos de equinos com laminite induzida por oligofrutose, impedindo ou atenuando danos teciduais. Foram utilizados 12 equinos, fêmeas, sem raça definida com idade média de $10,5 \pm 5$ anos, pesando 430 ± 35 kg, escore corporal 6 ± 1 (escore de 1 a 9), sem histórico prévio de claudicação. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, controle (CON n=6) e tratado (LEUCO n=6). Setenta e duas horas antecedendo a indução (T-72), todos os animais receberam 1g/kg de peso vivo de oligofrutose via sonda nasogástrica que foi repetido durante mais dois dias (T-48 e T-24) sendo esses considerados período de sensibilização. No quarto dia (T0) todos os animais receberam 10g/kg pela mesma via com o mesmo volume que foi considerado período indução da laminite. Passadas 12 horas após o T0 os animais do grupo tratado foram submetidos aos procedimentos de leucoaférese utilizando uma máquina com sistema de aférese Cobe Spectra (Terumo BCT, Lakewood USA), com kit comercial Terumo BCT WBC por sistema de coleta por fluxo contínuo com duplo acesso venoso. Nos tempos D0, e pós-indução em T12, T36 e T60 horas, biópsias de cada casco foram coletadas sequencialmente no membro pélvico esquerdo (D0 - controle), pélvico direito (T12), torácico direito (T36) e torácico esquerdo (T60) e as amostras foram

encaminhadas para exames histológicos (H&E e PAS) e imunohistoquímicos para marcação de calprotectina (CP). Houve aumento de leucócitos entre os tempos T0 e T12 e quando comparado à contagem de leucócitos no grupo CON houve diferença ($P = 0,0067$) entre T36 e os demais tempos. No grupo LEUCO, não houve diferenças entre os tempos. Entre os grupos foram observadas diferenças estatísticas ($P = 0,0087$) entre T36. Em relação ao escore de infiltração de neutrófilos, também foi observada diferença estatística ($P = 0,0248$) no escore de neutrófilos no T36 entre os grupos. No CON, um animal apresentou escore 4, dois apresentaram escore 3 e escore 2 e um apresentou escore 1. No LEUCO, um animal apresentou escore 4, dois apresentaram escore 2 e três apresentaram escore 1. A intensidade da lesão por PAS no grupo CON o T36 diferenciou ($P = 0,0001$) dos restantes dos tempos e no LEUCO houve diferença entre o T60 e T36 em relação ao T0. Os valores da CP não revelaram diferenças estatísticas entre os grupos e o T60 foi diferente dos demais tempos do mesmo grupo e entre os grupos. Correlações positivas fortes ocorreram entre intensidade da lesão por PAS e marcação de CP ($R=0,77$), correlações moderadas foram observadas entre intensidade de lesão por PAS e escore de neutrófilos ($R=0,54$) e o PAS e contagem de neutrófilos ($R= 0,55$). Também revelaram correlações positivas moderadas entre CP e escore de neutrófilos ($R=0,53$) e CP e contagem de neutrófilos ($R=0,55$). Em conclusão, o protocolo de leucoaférese se mostrou benéfico em reduzir o infiltrado leucocitário no casco e retardar a evolução da lesão tecidual em equinos com laminite e sepse induzida por oligofrutose. A infiltração leucocitária precedeu o desprendimento de células epidermais da membrana basal.

Palavras chaves: cavalos, leucócitos, sepse, aférese.

ABSTRACT

The present study aimed to identify the intensity of leukocyte infiltration and the degree of damage in laminar tissue of horses with acute laminitis induced by a model using oligofructose and submitted to systemic sequestration of inflammatory cells by the automated leukapheresis technique. The hypothesis is that leukapheresis will be able to reduce the presence of inflammatory cells in the dermal laminae in horses' hooves with oligofructose induced laminitis, reducing or attenuating tissue damage. Twelve non-defined equine females with a mean age of 10.5 ± 5 years, weighing 430 ± 35 kg, body score 6 ± 1 (score from 1 to 9), without previous history of claudication were used. The animals were randomly divided into two groups, control (CON $n = 6$) and treated (LEUCO $n = 6$). Seventy-two hours prior to induction (T-72), all animals received 1g / kg oligofructose live weight via a nasogastric tube which was repeated for two more days (T-48 and T-24) . On the fourth day (T0) all animals received 10g / kg by the same route with the same volume that was considered induction period of laminitis. Twelve hours after T0, the animals were submitted to leukapheresis procedures using a Cobe Spectra (Terumo BCT, Lakewood USA) apheresis system with commercial Terumo BCT WBC kit for a double venous access control system. At the D0 and post-induction

times at T12, T36 and T60 hours, biopsies from each hull were collected sequentially on the left (D0 - control), right (T12), right (T36) and left (T60) pelvic limbs and samples were submitted to histological exams (H & E and PAS) and immunohistochemical for calprotectin (CP) labeling. There was an increase in leukocytes between the T0 and T12 times and when compared to the leukocyte count in the CON group there was a statistical difference ($P = 0.0067$) between T36 and other times. In the LEUCO group, there were no statistical differences between the times. Among the groups significant statistical differences ($P = 0.0087$) were observed between T36. In relation to the neutrophil infiltration score, we also observed a statistical difference ($P = 0.0248$) in the T36 neutrophil score between the groups. In the COM, one animal presented score 4, two presented score 3 and score 2 and one presented score 1. In LEUCO, one animal had score 4, two presented score 2 and three presented score 1. The intensity of injury by SBP in the CON group The T36 statistically differentiated ($P = 0.0001$) from the rest of the times and in LEUCO there was a difference between T60 and T36 in relation to T0. The CP values did not reveal statistical differences between the groups and the T60 was different from the other times of the same group and between the groups. Positive correlations occurred between the intensity of the SBP injury and the CP marking ($R = 0.77$) and the neutrophil score with the neutrophil count ($R = 0.78$), moderate correlations were observed between SBP intensity and score Of neutrophils ($R = 0.54$) and SBP and neutrophil count ($R = 0.55$). They also revealed moderate positive correlations between CP and neutrophil score ($R = 0.53$) and CP and neutrophil count ($R = 0.55$). The leukapheresis protocol was efficient in reducing leukocyte infiltration and postpone tecidual damage in horses with oligofructose-induced sepsis and laminitis. Leukocyte infiltration precede epidermal detachment of basal membrane.

Key words: Horses, leukocytes, sepsis, apheresis.

1. INTRODUÇÃO

A laminite é uma afecção comum na rotina de veterinários que trabalham com a espécie equina e num passado recentemente sua fisiopatologia estava indefinida. Atualmente, muitas descobertas começaram a elucidar esse fenômeno biológico que causa danos às lâminas dérmicas e que pode colocar em risco a vida dos animais acometidos (Laskoski et al., 2016).

Diversos modelos que induzem a laminite inflamatória estão bem documentados, dentre eles estão o que utilizam a oligofructose, o amido e o extrato de noqueira preta e em todos eles já foram descritos a relação da laminite com a sepse, a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) bem como a migração de leucócitos para o casco (Belknap et al., 2009, Faleiros et al., 2011b; Lima et al., 2013). Mais recentemente, também foi documentada a migração de leucócitos para o tecido lamelar previamente aos sinais de laminite em equinos com cólica (Laskoski et al., 2015; Laskoski et al., 2016).

Diversos autores (Belknap et al., 2006, Faleiros et al., 2009, Faleiros et al., 2011; Katz e Bailey, 2012; Lima et al., 2013; Faleiros & Belknap 2017) descrevem que há uma íntima relação da SIRS, MODS e a laminite. Isso se dá pelo influxo de leucócitos da circulação sistêmica para o casco como também a ativação de células inflamatórias residentes por mediadores inflamatórios liberados nessas duas síndromes. Desta forma, pesquisas tentando inibir a migração (Lima et al., 2013) para o casco dos equinos com laminite aguda já foram realizados e essa pode ser uma estratégia positiva para minimizar danos nas lâminas demais.

Assim, justifica-se o uso da leucoaférese na tentativa de amenizar a migração de leucócitos para os cascos dos equinos submetidos a esse procedimento bem como atenuar os danos nas lâminas dérmicas. A hipótese é que o uso terapêutico a leucoaférese será capaz de reduzir a presença de células inflamatórias nas lâminas dérmicas nos cascos de equinos com laminite induzida por oligofrutose, reduzindo ou atenuando danos lamelares.

O presente estudo teve como objetivo identificar a intensidade da infiltração de leucócitos e o grau de dano no tecido laminar do casco de cavalos com laminite aguda induzida por um modelo utilizando a oligofrutose e submetidos ao sequestro sistêmico de células inflamatórias pela técnica de leucoaférese automatizada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia experimental foi aprovada pelo Comitê de Ética Sobre Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG 281/2013). Foram utilizados doze equinos, fêmeas, sem raça definida com idade média de $10,5 \pm 5$ anos, pesando 430 ± 35 kg, escore corporal 6 ± 1 (escore de 1 a 9), sem histórico prévio de claudicação, prenhes negativa, previamente adaptadas por 1 semana ao confinamento em baia e a uma dieta exclusiva à base de feno de gramínea (*Cynodum sp*). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (N=60), controle (CON) e tratado (LEUCO) e permaneceram instalados no setor de Cirurgia de Grandes Animais da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) entre os meses de junho e julho.

2.1. INDUÇÃO DA LAMINITE

Setenta e duas horas antecedendo a indução (T-72), todos os animais receberam 1g/kg de peso vivo de oligofrutose (Raftilose P95 – Embrapharma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda), diluídos em 3 litros de água, via sonda nasogástrica que foi repetido durante mais dois dias (T-48 e T-24) sendo esses considerados período de sensibilização. No quarto dia (T0) todos os animais receberam 10g/kg pela mesma via

com o mesmo volume que foi considerado período indução da laminite (adaptado de Lima *et al.*, 2013, Lima *et al.*, 2016 e Van Eps e Pollit, 2006).

2.2. GRUPO TRATADO – LEUCOAFÉRESE (LEUCO)

Conforme descrito no Capítulo 3, passadas 12 horas após o T0 e para a realização dos procedimentos de leucoaférese, os equinos eram contidos em tronco, sedados com cloridrato de detomidina (Dormium, Agener União) na dose de 20 mcg/kg, IV. Em seguida ambas as jugulares foram canuladas com cateteres 14 G (Teflon-Entfe). Para a separação dos leucócitos, foi utilizada uma máquina com sistema de aférese Cobe Spectra (Terumo BCT, Lakewood USA), com kit comercial Terumo BCT WBC por sistema de coleta por fluxo contínuo com duplo acesso venoso. Nos primeiros 1000 ml de sangue processados não foi realizada a coleta, permitindo o ajuste do plasma leucoplaquetário (*buffy coat*). A separação dos leucócitos foi feita por meio de centrifugação (765 RPM), com fator de separação 500, até serem processados um total 18000 ml de sangue (a taxa de retirada foi de 75 ml por minuto). Para evitar coagulação do sangue presente no sistema e no momento da reinfusão, foi associado o anticoagulante citrato dextrose (taxa de infusão de 4ml/min). O sangue total foi retirado pela via de coleta (jugular direita), sendo os leucócitos acondicionados em bolsa de transfusão de sangue de 500 ml. Os demais hemocomponentes foram reinfundidos (jugular esquerda) no animal em fluxo contínuo, simultaneamente à separação dos leucócitos sem contaminação ou manipulação direta do sangue.

Imediatamente após a realização da leucoaférese, todos os animais desse grupo foram sondados com uma sonda nasogástrica de 11mm para administração de fluido enteral constituído de 80,55g de cloreto de sódio (NaCl), mais 5,55g de cloreto de potássio (KCl) e 56,7g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) diluídos em 15 litros de água na dose de 30 ml/kg/hora. Esta terapia durou em média um período de 12 horas.

2.3. BIÓPSIA DOS CASCOS

Nos tempos D0, e pós-indução em T12, T36 e T60 horas, biópsias de cada casco foram coletadas sequencialmente no membro pélvico esquerdo (D0 - controle), pélvico direito (T12), torácico direito (T36) e torácico esquerdo (T60). Conforme metodologia descrita no Capítulo 2, antes de cada biópsia os animais foram sedados com detomidina (Dormium – Agener União 0,1 µg/kg peso vivo IV) e os cascos foram desensibilizados através anestesia perineural (lidocaína 2%, 5 ml em cada ramo no nervo palmar/plantar) ao nível da superfície abaxial dos ossos sesamóides proximais. As amostras obtidas foram armazenadas em formalina tamponada 10% para estudos histológicos. As aberturas nos cascos onde eram realizadas as biópsias foram fechadas com polimetilmetacrilato (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, Ltda). As amostras foram processadas histologicamente e inclusas em parafina. Cortes histológicos com 5µm de

espessura foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Os cortes corados com H&E foram usados para avaliação das células lamelares, especialmente ceratinócitos. A coloração com PAS foi utilizada para observação de anormalidades associadas com a membrana basal (MB). Para melhor descrição das alterações ocorridas nas lâminas antes da degradação da membrana basal utilizou-se o sistema de graduação histológica proposto por Faleiros et al., (2011b) (Tabela 1) e conforme metodologia utilizada por Lima (2012).

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

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

Nesse novo sistema, os graus de 1 a 3 originais foram representados pelos graus 4 a 6. Todos os cortes foram analisados por um investigador alheio aos tempos de coleta e aos grupos de tratamento.

Com o objetivo de localizar de forma mais precisa a presença de leucócitos nos cortes histológicos, a imunolocalização da calprotectina foi realizada segundo (Faleiros et al., 2009 a,b). Cortes histológicos com 5µm de espessura foram aderidos em lâminas de vidro gelatinizadas. Realizou-se a desparafinização em xilol e em seguida a hidratação dos cortes em gradiente decrescente de álcool etílico. A recuperação antigênica foi realizada com proteinase K (20µg/mL do Hidroximetil aminometano “TRIS” – solução tampão) durante 5 minutos. A inativação da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio a 9% durante 15 minutos em dois banhos consecutivos. O anticorpo primário (MAC387, Abcam) na diluição 1:250 foi incubado a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Utilizou-se anticorpo secundário anti-IgG de camundongo incubado na diluição de 1:100 por 30 minutos. Para a identificação de marcações utilizou-se o

sistema ABC incubado por 30 minutos seguido do cromógeno Novared (Vector Laboratories Inc.) por 5 minutos. A análise dos cortes para imunohistoquímica foi feita por um pesquisador alheio aos grupos de tratamento.

Um escore de 0 a 5 foi aplicado para cada amostra de acordo com a marcação imunohistoquímica das células epidérmicas: (0) nenhum sinal, (1) manchas de sinais localizados, (2) presença de áreas de sinais difusos em até 25% das lamínas epidérmicas (3) presença de áreas de sinais difusos entre 25 e 50% das lamínas epidérmicas e alguns leucócitos na derme, (4) presença de áreas de sinais difusos entre 50 e 75% das lamínas epidérmicas, (5) presença de áreas de sinais difusos em mais de 75% das lamínas epidérmicas (Faleiros et al., 2011b). Da mesma forma, um escore de 0 a 4 foi aplicado de acordo com presença de leucócitos presentes nas lâminas dérmicas: (0) ausência de leucócitos, (1) raros leucócitos nas lâminas dérmicas, (2) discreta presença de leucócitos nas lâminas dérmicas, (3) moderada presença de leucócitos, (4) intensa presença de leucócitos nas lâminas dérmicas (Laskoski et al., 2015).

2.4. ANÁLISE DE IMAGEM

Todas as lâminas foram examinadas por microscopia óptica de modo a identificar a presença e localização de células coradas. Imagens digitais/slides foram obtidos a partir de secções coradas usando uma varredura por um robô automatizado (Scanner de lâminas 3D Histech) com uma ampliação de 40 vezes em um período de amostragem espacial de 0,2 m por pixel (Faleiros et al., 2011b). A pesquisa de leucócitos mielóides foi realizada pela contagem de células positivas para o anticorpo, usando software de computador (Pannoramic viewer) com aumento de 20x, contando 20 campos por lâmina.

A análise estatística foi feita por ANOVA em blocos ao acaso seguida pelo teste de Student-Neulman-Kelus, usando software (GraphPad Prism 5.0). Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Friedman seguido pelo teste de Dunns.

No sentido de testar algum tipo de relação entre infiltração de neutrófilos e lesão da epiderme, utilizou-se os testes de Pearson e Spearman para verificar correlação entre infiltração de neutrófilos, calprotectina, escore de lesão tecidual laminar. Também comparou-se as contagens de neutrófilos em cortes com (graus de 3 a 6) e sem (graus de 0 a 2) descolamento de leucócitos da membrana basal.

Para determinar a razão de chance (odds ratio) entre infiltrado de leucócitos e lesão da membrana basal, estabeleceu-se um valor de corte para contagem de leucócitos equivalente a três vezes o valor médio das contagens dos valores basais. Assim a incidência de presença ou não de descolamento de ceratinócitos da membrana basal foi verificada em amostras com valores abaixo ou acima do valor de corte pelo teste exato de Fisher. Posteriormente, calculou-se a razão de chance (odds ratio) entre infiltração de

leucócitos (incidência > que três vezes os valores basais) e a presença de descolamento de ceratinócitos da membrana basal (grau PAS > 2). Para todos os testes considerou-se nível de significância de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

O protocolo proposto com administração de oligofrutose utilizando 1 g/kg VO no período de sensibilização associado a 10g/kg VO no momento da indução utilizado nessa pesquisa foi eficiente em induzir quadro de laminite como também quadro de sepsis nos animais dos dois grupos. A metodologia de biópsia do casco descrito no Capítulo 2 foi considerada eficaz para o recolhimento de amostras de tecidos lamelares do casco dos equinos e não causou nenhum transtorno no delineamento experimental.

Como já descrito no capítulo IV, em ambos os grupos, a administração de oligofrutose utilizando 1 g/kg VO no período de sensibilização associado a 10g/kg VO no momento da indução promoveu, além da diarreia, um quadro de taquicardia, congestão de mucosas, aumento do tempo de preenchimento capilar e hipertemia. Conforme demonstrado na Figura 1, os resultados são apresentados no grupo CON até T36, quando ocorreram as mortes dos animais, enquanto que no grupo LEUCO os resultados incluem a biópsia do T60.

No CON, a incidência de leucócitos CP+ lamelares atingiu seu pico em T36 com valores 22,2 vezes superiores aos basais ($P = 0,0067$) e 7,3 vezes superiores ao T36 do LEUCO ($P = 0,0087$). Já no grupo LEUCO, o pico foi em T60, contudo não houve diferenças entre os tempos (Fig. 1a).

No grupo controle, em T36, a intensidade da lesão foi superior ($P = 0,0001$) aos demais tempos. Já no LEUCO houve diferença entre o T60 e T36 em relação ao T0 (Figura 1b). Entre os grupos, não houve diferença estatística nos escores de lesão. Contudo, histologicamente verificou-se um fato relevante em T36. No LEUCO, dois (33%) indivíduos apresentaram grau 1 e quatro (66%) grau 2, sem que nenhuma das amostras apresentasse sinais de descolamento dos ceratinócitos da membrana basal. Já no CON quatro animais (66%) apresentaram grau 2 e dois (33%) apresentaram grau 3 que inclui descolamento e colapso da membrana basal.

Quanto à intensidade de marcação para calprotectina nas células epidérmicas, a única diferença observada foi no LEUCO entre T0 e T60 (Figura 1c). Verificou-se que amostras com descolamento de ceratinócitos apresentaram em média 8 vezes mais leucócitos que amostras sem este tipo de lesão (29,9 vs 3,32 células/mm², $P < 0,001$). Amostras com infiltração leucocitária evidente (incidência superior a três vezes os valores médios basais) apresentaram 85,7% de incidência de descolamento de ceratinócitos da membrana basal (grau PAS > 2), comparado com 17,1% de incidência dessa lesão em animais sem infiltração evidente. A avaliação de *odds ratio* mostrou que

amostras com infiltração leucocitária evidente têm 19 vezes (IC: 1,89 a 191; $P=0,006$) mais chance de apresentar esta lesão que amostras sem infiltração evidente (Figura 2).

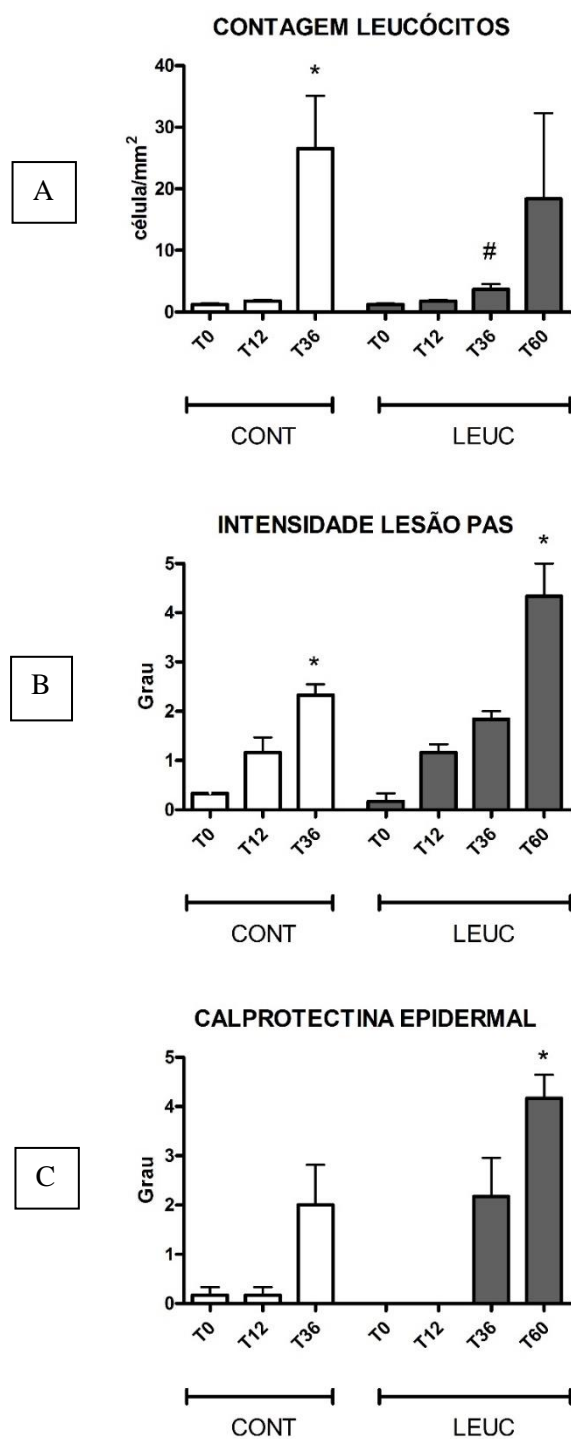


Figura 1 – Médias (\pm EP) das contagens de células/leucócitos positivas para caproectina (A) e graus para lesão histológica/PAS (B) e expressão de calprotectina na epiderme (C) em equinos submetidos a laminite induzida por oligofruose, tratados (LEUCO) ou não (CON) com leucoaférese. Diferenças entre os tempos (*); diferenças entre os grupos (#).

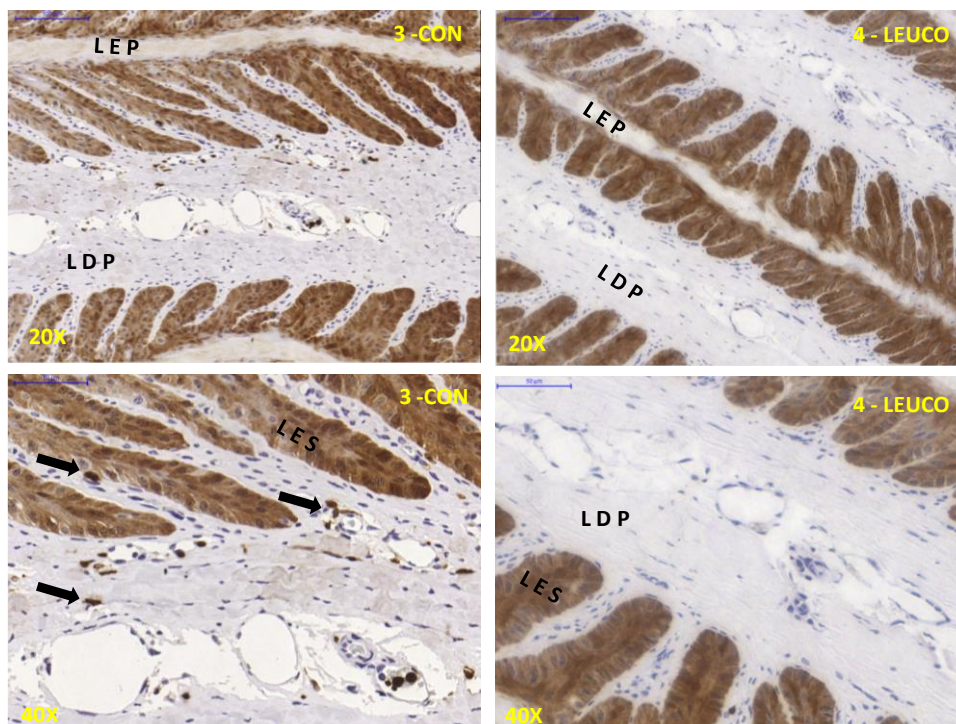


Figura 2: Fotografia das lâminas dermais de equinos do grupo controle COM e LEUCO em aumento de 20 x e 40 x revelando a presença de leucócitos marcados pela calprotectina (setas pretas) e a diferença da morfologia das lâminas epidermais secundárias (LES) desse grupo com as do grupo submetidos ao protocolo de leucoaférese (LEUCO).

4. DISCUSSÃO

A técnica de imuno-histoquímica empregada corrobora resultados prévios da rara presença de leucócitos positivos para calprotectina (CP⁺) no tecido lamelar de equinos normais (Faleiros et al., 2009a, Faleiros et al., 2011b) com uma média (\pm DP) $1,12 \pm 0,34$ células/mm² considerando as amostras basais dos dois grupos. Em T12 não houve alteração significativa de valores. Contudo em T36, com a presença dos sintomas de SIRS e laminite, a contagem média nos animais não tratados foi de $26,6 \pm 19,3$ células/mm², representando um aumento de 22,2 vezes em relação aos basais. Tais resultados demonstram que, à semelhança do que ocorre nos modelos de laminite séptica com noqueira preta (Faleiros et al. 2009b) e sobrecarga de amido (Faleiros et al., 2011a) e nos casos de inflamação no tecido lamelar decorrente de obstruções intestinais naturais (Laskoski et al., 2015) ou induzidas (Laskoski et al., 2012), na laminite induzida por oligofrutose também ocorre infiltração leucocitária que antecede as lesões estruturais do tecido lamelar.

A estreita relação entre infiltrado leucocitário e lesão do tecido lamelar também fica evidente quando se compara as contagens de leucócitos em amostras com e sem descolamento de ceratinócitos e lesão de membrana basal, que apresentaram oito vezes mais leucócitos que amostras sem este tipo de lesão. Também pela alta incidência desse

tipo de lesão (87%) em amostras com contagens superiores a três vezes a média basal, que apresentaram 19 vezes mais chance de desenvolver danos na membrana basal.

De forma curiosa, observou-se que as contagens no tecido lamelar em T36 estiveram aquém dos registrados no início da claudicação em modelos de laminite usando noqueira preta (Faleiros et al., 2009a) e sobrecarga de amido (Faleiros et al., 2011b). No modelo de noqueira preta os valores chegaram a $59,6 \pm 11,6$ células/mm² (Faleiros et al., 2009a) e no modelo da sobrecarga de amido foram de $43,4 \pm 15,7$ células/mm² (Faleiros et al., 2011b). Algumas diferenças de metodologia entre o presente estudo e os citados poderiam estar envolvidos nessa discrepância como a forma de coleta das amostras (biópsia x necropsia), a técnica de imunohistoquímica e a metodologia para contagem de células. Entretanto, deve-se considerar que haja possíveis diferenças inflamatórias promovidas pelo modelo de oligofrutose no tecido lamelar.

Por exemplo, quando se comparam os resultados desse estudo com as pesquisas realizadas por Faleiros et al., (2009a), que utilizaram o método de indução de laminite com extrato de noqueira preta, observa-se uma elevação de leucócitos aqui, mais tardia do que foi encontrada por esses autores. No grupo CON, principalmente, a maior contagem de leucócitos se deu o T36 enquanto que nos resultados descritos por Faleiros et al., (2009a) a elevação se deu no período de 4 horas (cerca de 140 leucócitos/mm²) após a indução. Tais diferenças podem ser explicadas pelo fato já conhecido de que a noqueira preta provoca uma resposta inflamatória mais cedo do que os modelos sobrecarga de amido (Hurley et al., 2006) e de oligofrutose (Faleiros et al., 2011b), com infiltração neutrofílica das lâminas acontecendo mais precocemente.

Já em outros estudos (Laskoski et al., 2012) avaliou-se o efeito da hidrocortisona sobre a migração de leucócitos para lâminas dérmicas em equinos submetidos à distensão de jejuno com amostras de cascos obtidas 18 horas após a distensão no grupo controle (n=7 CG), grupo instrumentado (n=5 GI) e grupo não tratado (n=4 GNT). Este estudo revelou média de leucócitos (de 0,35 a 0,72 células/mm²) inferiores às encontradas aqui nesta pesquisa. Uma possível explicação para essa diferença de leucócitos nesses tempos após a indução seria o modelo experimental usados por esses autores, que, mesmo induzindo inflamação, essa não é tão intensa como é a causada pelo protocolo de indução de laminite com oligofrutose.

As análises das contagens de leucócitos no LEUCO não revelaram aumentos significativos no T36 em relação aos valores basais e demonstram que o protocolo de leucoaférese reduziu significativamente (em 8 vezes) a concentração de neutrófilos no tecido lamelar em relação ao grupo controle nesse tempo. O aumento dos leucócitos no T36 foi condizente com a piora clínica dos animais dos dois grupos, porém, nesse período os animais do grupo CON foram ao óbito enquanto que esse fato não foi visto no grupo LEUCO.

Se comparada as médias anteriores ao LEUCO, esse grupo revela médias bem inferiores no T36 e T60. Isso mostra a eficiência da leucoaférese em reduzir o infiltrado inflamatório nas lâminas e conseqüentemente, somadas a sobrevida dos equinos do LEUCO, cria um retardamento no aparecimento dos sinais clínicos da laminite, abrindo uma janela terapêutica e possibilitando, na prática, ao clínico, tomadas de decisões mais acuradas e a implantação de um tratamento multimodal.

Em T36, a membrana basal do LEUCO não revelou alterações e as lâminas dérmicas não sofreram afinamento e nem formaram gotas nas suas extremidades, alterações que foram encontradas no grupo CON. Outro achado importante no grupo LEUCO foi o número de neutrófilos bem abaixo do encontrado no CON, esse fato poderia explicar as lesões ou alterações encontradas nas lâminas desse grupo (CON). Isso reforça o que foi descrito por Faleiros et al. (2009a), Lima et al. (2016) que a lesão na membrana basal e nas células epidermias são causadas diretamente pela chegada dos leucócitos nas fases agudas.

Em relação ao escore de infiltração de neutrófilos, também foi observada diferença estatística ($P = 0,0248$) no T36 entre os grupos. No CON, um animal apresentou escore 4, dois apresentaram escore 3, dois escore 2 e um apresentou escore 1 (média 2,5). No LEUCO, um animal apresentou escore 4, dois apresentaram escore 2 e três apresentaram escore 1 (média 1,83). Pesquisadores (Laskoski et al. 2015) ao examinarem escore de animais que foram a óbito por afecções gastrointestinais, com equinos divididos em um grupo com leucopenia (LG – 07 animais) e outro sem leucopenia (NLG – 11 animais), encontraram lesões em todos os indivíduos do grupo LG e ainda nesse grupo registraram três equinos com escore 1-2, quatro com escore 3 em pelo menos um dos membros. O NLG encontraram sete cavalos com grau 1-2, três cavalos grau 3 e um cavalo tinha Grau 0. Estes autores correlacionam o infiltrado inflamatório laminar com a leucopenia. Esse relato auxilia na ideia de que o sequestro de leucócitos pela leucoaférese pode ser uma boa forma de impedir ou retardar o infiltrado inflamatório no casco dos cavalos atrasando ou eliminando diretamente os sinais de laminite bem como, reforça o que já foi descrito por outros autores (Faleiros et al., 2009a) que o aparecimento das lesões nas lâminas estão diretamente ligadas a migração dos leucócitos para os cascos.

Ainda, estes autores (Laskoski et al., 2015) observaram aumento na infiltração de leucócitos em animais com distúrbios gastrointestinais antes do desenvolvimento de sinais clínicos, uma vez que apenas um cavalo (NLG) mostrou claudicação, e este cavalo demonstrou leucopenia antes da laminite. Isso permite afirmar que a leucoaférese realizada 12 horas após a indução seria um prazo interessante para impedir a chegada dos leucócitos nas lâminas dermais.

Outros autores relatam média de escore 1 (grupo controle) e 2 (tratados) num modelo de indução de oligofrutose e tratados com CXCR1 no T36 do seu estudo (Lima et al., 2016). Tais resultados estão com médias abaixo das encontradas nessa pesquisa. Os

pesquisadores justificam essas médias devido à variabilidade amostral, o tamanho da biópsia que foram um limitante na sua pesquisa, bem como uma laminite branda que, acreditamos ter relação com a dose *bolus* e ausência de dose de pré-sensibilização.

Em T12 as mudanças histológicas foram de pouca importância e consistiram de mudança na orientação de núcleos epiteliais ovais, que já não estavam orientados perpendiculares ao eixo longo das LES. Alguns núcleos estavam arredondados e localizados mais no citoplasma das células epiteliais. As extremidades das LES foram se mostrando afiladas. As LDSs se apresentavam mais finas e a MB se corou diversificadamente com menor intensidade em torno das bases do LDS. Poucos leucócitos foram marcados nesse momento e sempre estavam na região perivascular e raros se encontravam nas LDP. Croser e Pollitt, (2006) relataram o surgimento de lesões histológicas muito semelhantes em equino induzido pelo modelo de OF após 12 horas da indução, isso pode justificar, mesmo que em pequena quantidade, o aumento dos leucócitos no T12 desse experimento. Ainda, o mesmo autor correlaciona essas lesões com o surgimento dos sinais clínicos sistêmicos nesse período com as lesões histológicas o que também foi evidenciado nesse estudo.

Nourian et al. (2007) acharam praticamente as mesmas alterações citológicas e estruturais em equinos com laminite induzida com OF e com amostras analisadas após 24 e 30 horas da indução, porém, esses pesquisadores se restringiram em avaliar somente as alterações e não avaliaram a migração ou relação de leucócitos e os danos laminares.

No T36 as alterações histológicas foram mais marcantes e importantes no grupo CON se comparada ao LEUCO e consistiram de mudança na orientação de núcleos epiteliais de ovais para alongados com redução na largura e alongamento das LES com afilamento da sua extremidade. Em algumas lâminas/animais era possível observar a formação de vacúolos entre as extremidades das LES e a MB. Os leucócitos estavam bem evidentes e em grande quantidade distribuídos na LDP e entre a MB, LDS e LES.

Em um estudo avaliando equinos submetidos a protocolo de indução de laminite pela OF por um período de 7 dias após a indução, foram observados assimetria e alongamento com alguns pontos de encurtamento das LES, retração da LEP/eixo queratinizado com desconexão entre LES e LEP (ilhas), figuras de leucócitos (H&E, PAS). MB aderida a LES quando essa estava conectada a LEP, figuras de apoptose (Van Eps et al., 2009). Os autores relatam que passado período da inflamação aguda (1,5 dia) e os processos que induziram as lesões lamelares, o deslocamento das células basais e desarranjos observados no tecido pareciam ter diminuído (após 5,5 dias). Quase todas as células epidérmicas estavam desenvolvidas e a MB parecia normal mostrando que a forma e a orientação das células epidérmicas basais encontravam-se normais nas ilhas. Entretanto, a maior anomalia foi a mudança na arquitetura lamelar. A anatomia das LEP e LES encontrava-se severamente perturbada. Os filamento/lâminas e as ilhas epidérmicas, muitas das quais já não estavam ligadas LEP, tinham claramente perdido a

sua capacidade de funcionar como um aparelho de suspensão entre a parede do casco e a falange distal.

A intensidade da lesão por PAS no grupo CON no T36 diferenciou estatisticamente dos restantes dos tempos e no LEUCO houve diferença só no T60. Entre os grupos, não houve diferença estatística, porém, histologicamente lesões estruturais são evidentes entre os grupos (Figura 1b). Dois (33%) animais do CON apresentaram escore 3 e outros quatro (66%) escore 2 no T36, já no LEUCO, nenhum animal atingiu escore 3, quatro (66%) apresentaram escore 2 e dois (33%) indivíduos apresentaram escore 1 nesse mesmo tempo. Resultados iguais ao grupo CON e acima do grupo LEU foram encontrados por Faleiros et al. (2009a). Tais pesquisadores encontraram 2/6 (33%) animais com escore 3 e 1/6 (16%) com escore 4 em equinos com laminite experimental induzida com carboidratos e com exames histológicos entre 20 a 48 horas após a indução. Esses resultados indicam que leucoaférese amenizou os efeitos da sepse sobre o escore da intensidade de lesão no grupo tratado.

Na análise da intensidade de expressão de CP no tecido lamelar epidermal não houve diferenças estatísticas até T36 em ambos os grupos, havendo diferença entre T0 e T60 do LEUCO. A calprotectina também é classificada como uma molécula de padrão molecular associada a dano (DAMP), um termo que descreve partículas liberadas de células hospedeiras danificadas que induzem sinalização inflamatória. É uma molécula normalmente encontrada em granulócitos, monócitos, nos estágios de diferenciação precoces de macrófagos, nas células epiteliais quando estão sob tensão e em monócitos ativados, mas não em ceratinócitos normais (Chiavaccini et al., 2011). Faleiros e Belknap (2017) aventaram a hipótese de que a presença do infiltrado leucocitário poderia induzir a expressão de calprotectina nos ceratinócitos do tecido lamelar. Entretanto observou-se em T36 que alguns animais do LEUCO apresentaram intensa expressão na epiderme sem que houvesse infiltrado leucocitário evidente. Esta ocorrência em T36 demonstra também que a expressão da calprotectina das células epidermais, revelando inflamação, não ocorre necessariamente concomitante com o descolamento dos ceratinócitos e dano à membrana basal (Figura 2).

Lima et al. (2016) encontraram escores para expressão de CP em equinos submetidos a protocolo de indução de OF entre 2 e 3 no T36. Tais resultados são abaixo dos observados no presente estudo em ambos os grupos nesse mesmo tempo. A explicação para essas diferenças deve ser a dose de pré-sensibilização utilizada no presente estudo que iniciou o processo de mudanças na microbiota intestinal e potencializou o efeito da dose de indução induzindo resposta inflamatória mais exacerbada com maior número de DAMPs e PAMPs circulantes.

Em um estudo de lesão de reperfusão em equinos submetidos a distensão de jejuno com amostras de cascos obtidas 18 horas após a distensão Laskoski et al., (2012) não encontraram marcação da CP em LES. Os próprios autores sugeriram que a resposta inflamatória promovida pela distensão do jejuno foi suficiente para iniciar o acúmulo

leucocitário remoto no tecido lamelar dos cascos. Mas que às 18 horas de reperfusão, quando as amostras foram colhidas, o insulto ainda era insuficiente para induzir sinais evidentes do processo de desenvolvimento de laminite.

Os achados da histologia do casco estão em acordo com as alterações clínicas relatadas no Capítulo 4. Em ambos os grupos, a administração de oligofrutose utilizando 1 g/kg VO no período de sensibilização associado a 10g/kg VO no momento da indução promoveu, além da diarreia, um quadro de taquicardia, congestão de mucosas, aumento do tempo de preenchimento capilar e hipertemia. Tais sinais são compatíveis com um quadro normalmente denominado como endotoxemia na literatura equina, mas que modernamente tem sido denominado como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (Taylor, 2015). Os animais do CON apresentaram sinais clínicos condizentes com SIRS que resultou com a falência múltipla de órgãos que foi considerada a causa dos óbitos desses indivíduos. O fato do tratamento prevenir a infiltração leucocitária e reduzir as lesões no tecido lamelar em T36 evidencia que o protocolo da leucoaférese atenuou a resposta inflamatória e consequente disfunção de múltiplos órgãos, evitando assim o óbito.

Além da sobrevivência dos animais do grupo LEUCO, pesquisas em humanos já confirmam que a leucoaférese é um procedimento útil no tratamento da SIRS. Kumagai et al. (2010) descreveram bons resultados no índice de sobrevivência de pacientes humanos com quadros de choque séptico que foram submetidos a um modelo de aférese que produziu sequestro de leucócitos ativados, reduzindo os neutrófilos em 78%, os monócitos em 70% e os linfócitos em 10%. Esses autores concluíram que esse procedimento melhora os efeitos deletérios teciduais da SIRS. Outras pesquisas direcionam a aférese no tratamento da sepse e SIRS para redução de citocinas e interleucinas (Stegmayr, 2000; Honore et al., 2013), endotoxinas (Motoki, 2005) em quadros de sepse. Também considera-se hoje o transplante de leucócitos de pacientes saudáveis para pacientes com SIRS. Obviamente, isso, não foi o intuito principal do presente estudo, porém, é uma nova linha de raciocínio que pode ser utilizada em novas pesquisas em equinos sépticos.

Corroborando os achados do presente estudo, Zhi-Gao et al. (2012), em um modelo de endotoxemia induzida em 24 cães, conseguiram atenuar as injúrias em órgãos distantes causadas pela SIRS com a técnica de leucoaférese num circuito de fluxo contínuo. Entretanto, mesmo com resultados promissores, os mesmos autores relataram que é um estudo preliminar e que outras pesquisas devem ser realizadas.

5. CONCLUSÃO

O protocolo de leucoaférese reduziu o infiltrado leucocitário e retardou o desenvolvimento de lesões lamelares em equinos com laminite induzida por oligofrutose. A infiltração leucocitária precedeu as lesões de descolamento dos ceratinócitos da membrana basal. Esses achados confirmam a importância da infiltração

leucocitária para o desenvolvimento das lesões estruturais no casco com laminite e revelam potencial terapêutico para uso da leucoaférese em sua prevenção.

6. REFERÊNCIAS

BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N.; CROUSER; E.C. Sepsis - from human organ failure to laminar failure. *Vet. Immunol. Immunopatho.* v.129, n. 155 – 157, 2009.

CHIAVACCINI, L.; HASSEL, D. M.; SHOEMAKER, M. et al. Detection of calprotectina and apoptotic activity within the equine colon from horses with black walnut extract-induced laminitis. *Vet. Immunol. Immunopath.* v. 144. p. 366 – 373, 2011.

CROSER, E. L.; POLLITT, C. C. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. In: *Proceedings. AAEP*, v.52, p.542-546, 2006.

FALEIROS, R. R.; LEISE. B. B.; WESTERMAN, C. Y., et al. In vivo and in vitro evidence of the involvement of CXCL1, a keratinocyte-derived chemokine, in equine laminitis., *J. Vet. Internal Medicine*, v.349, p.1-10, 2009b.

FALEIROS, R. R.; NUOVO, G. J.; BELKNAP, J. K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. *J. Vet. Internal Medicine*, v.23, n.1, p. 174-181, 2009a.

FALEIROS, R. R.; JOHNSON, P. J.; NUOVO G. J., et al. Lamellar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *J. Vet. Internal Medicine*, v.25, p. 107-115, 2011b.

FALEIROS, R. R.; LEISE, B. S.; WATTS, M., et al. Lamellar chemokine mRNA concentrations in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *Vet. Immun. Immunop.*, v.15, n.1-2, p. 45-51, 2011a.

FALEIROS, R. R.; BELKNAP, J. K. Leukocytes and Inflammatory Signaling in Laminitis: Leukocytes. In: James K Belknap. (Org.). *Equine Laminitis*. 1ed.Hoboken, NJ: Wiley, 2016, v. p. 91-101.

FRENCH, K. R., POLLITT C. C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. *Equine vet. J.* v. 36, n. 3, p. 230-235, 2004.

HONORE, P. M.; JACOBS, R.; JOANNES-BOYAU, O. et al. Nely designed CRRT membranes for sepsis an SIRS – A pragmatic approach for bedside intensivists

summarizing the more recent advances: A systematic structured review. *ASAIO J.* 2013. DOI: 10.1097/MAT.0b013e3182816a75.

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

KATZ, L. M.; BAILEY, S. R. A review of recent advances and current hypotheses on the pathogenesis of acute laminitis. *Equine. Vet. J.* v. 44, p. 752-761, 2012.

KUMAGAI, T.; TAKEYAMA, N.; YABUKI, T. et al. Apheresis of activated leukocytes an immobilized polymyxin B in a patients with septic shock. *Shock.* v. 34, n. 5, p. 461 – 466, 2010.

LASKOSKI, L. M.; VALADÃO, C. A. A.; ROSEMERE, O. et al. Gelatinase associated lipocalin neutrophils (NGAL) and calprotectin in lamelar tissue horses after jejunal obstruction, treated or not with hydrocortisone. *Braz. J. Vet. Research*, v.32, n.9, p. 817-823, 2012.

LASKOSKI, L. M.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; VALADÃO C. A. A. et al. Systemic leukopenia, evaluation of lamelar leukocyte infiltration and lamelar lesions in horses with naturally occurring colic syndrome. *Research Vet. Sci.*, v. 101, p. 15-21, 2015.

LASKOSKI, L. M.; VALADÃO, C. A. A; DITTRICH, R. L. et al. An update on laminitis. *Cienc. Rural.* v. 46, n. 3, 2016.

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, 2012. 51F. Tese (Doutorado em Medicina veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LIMA, L. R. et al. Histologic and inflammatory lamellar changes in horses with oligofructose-induced laminitis treated with a CXCR1/2 antagonist1. *Pesq. Vet. Bras.* v. 36, n. 1, p. 13-18, 2016.

LIMA, L. R.; MENDES, H. M. F.; SORIANI, F. M. et al. Clinical and hematologic equine laminitis subjected to a model oligofructose, treated or not with a receptor antagonist agent CXCR1/2. *Braz. Vet. Research*, v.33, n.8, p. 992-998, 2013.

MOTOKI, Y. Apheresis in critical care. In: Additional Abstract Submissions from the 5th World Congress of the International Society for Apheresis. Rostock-Warnemuende, Germany. May 4–7, 2005.

NOURIAN, A. R. et al. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24–30 hours after induction with oligofructose. *Equine vet. J.* v. 39, n.4, p. 360-364, 2007.

STEGMAY, B. G.; GUILLEVIN, L.; KORACH, J. M. et al. In: Additional Abstract Submissions from the 5th World Congress of the International Society for Apheresis. Rostock-Warnemuende, Germany. May 4–7, 2005.

TAYLOR, S. A review of equine sepsis. *Equine vet. Educ.* v. 27 n. 2, p. 99-109, 2015. doi: 10.1111/eve.12290.

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

VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Equine laminitis model: lamellar histopathology seven days after induction with oligofructose. *Equine vet. J.* v. 41, n.8, p. 735-740, 2009.

ZHI-GAO, H.; HUANG, J.; SHUN-GANG, Z. et al. Peripheral leukocytapheresis attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in vivo. *Mediat. of Inflamm.* v.1, p 1-9, 2012.