

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**

**APOPTOSE NO TECIDO LAMELAR DE EQUINOS SUBMETIDOS A DOIS  
MODELOS DE LAMINITE SÉPTICA E SUA CORRELAÇÃO COM A PRESENÇA  
DE LEUCÓCITOS**

**Antônio Catunda Pinho Neto**

**Belo Horizonte-MG**  
**2018**

Antônio Catunda Pinho Neto

APOPTOSE NO TECIDO LAMELAR DE EQUINOS SUBMETIDOS A DOIS  
MODELOS DE LAMINITE SÉPTICA E SUA CORRELAÇÃO COM A PRESENÇA  
DE LEUCÓCITOS

Defesa de dissertação apresentada à  
Escola de Veterinária da Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Resende  
Faleiros.

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2018

P654a Pinho Neto, Antônio Catunda, 1983-  
Apoptose no tecido lamelar de equinos submetidos a dois modelos de laminite séptica e sua correlação com a presença de leucócitos / Antônio Catunda Pinho Neto. – 2018.  
38 p. : il.

Orientador: Rafael Resende Faleiros  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

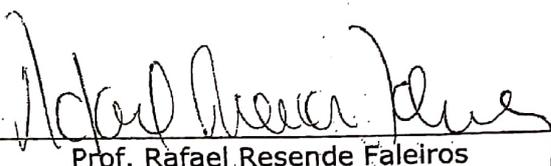
1. Equino – Doenças – Teses. 2. Laminite – Teses. 3. Apoptose – Teses. 4. Sepsis – Teses.  
I. Faleiros, Rafael Resende. II. Universidade Federal de Minas Gerais.  
Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 967

**FOLHA DE APROVAÇÃO****ANTONIO CATUNDA PINHO NETO**

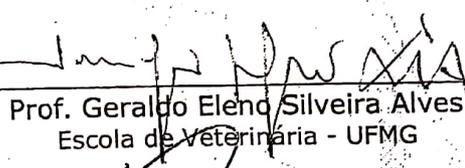
Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS .

Aprovada em 06 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



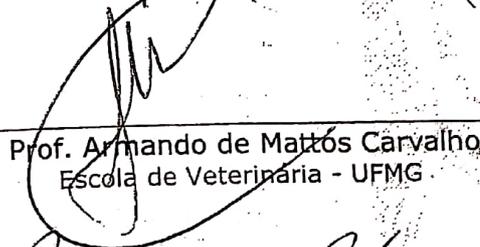
---

Prof. Rafael Resende Faleiros  
Presidente - Orientador



---

Prof. Geraldo Eleno Silveira Alves  
Escola de Veterinária - UFMG



---

Prof. Armando de Mattos Carvalho  
Escola de Veterinária - UFMG



---

Dr. Rodrigo Martins Ribeiro  
Centro Universitário de Mineiros - UNIFIMES



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia. Ao meu pai Francisco Freitas Carvalho e minha mãe Vanda Manley Catunda Carvalho, com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa de minha vida.

---

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a minha mãe Vanda Manley Catunda Carvalho, pelo apoio incondicional prestado, e pelos esforços por anos para proporcionar a melhor educação para seus filhos, como também por todo carinho amor e força.

Ao meu pai Francisco Freitas Carvalho que sempre esteve ao meu lado e junto de minha mãe foram os maiores incentivadores da minha trajetória, mesmo que meus planos fossem diferentes dos deles.

As minhas irmãs Camila Manley Catunda Carvalho e Morgana Manley Catunda Carvalho que acreditaram no meu sonho e me deram forças todos os dias, com palavras, sentimentos e energia.

Minha sobrinha Gabriela, que ainda não nasceu, mas que mesmo assim já é muito amada.

Aos meus avós maternos, Antônio (*In memória*) e Vera, e paternos, Manoel (*In memória*) Cleonice (*In memória*).

Minha Noiva Heloísa de Paula Pedroza por toda ajuda e companheirismo, mesmo nos momentos mais difíceis que passamos juntos e entender minha dedicação. Obrigado meu amor!

Um agradecimento especial ao meu Orientador e amigo prof. Dr. Rafael Resende Faleiros, pelas suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Eternamente grato por todo o apoio.

Aos meus professores de cirurgia, Geraldo Eleno, Armando Mattos e Andressa Silveira, pelos ensinamentos e amizade. Vale salientar que vocês são meus ícones que exalam sapiência.

Rodrigo Martins Ribeiro, um grande amigo que venho conhecendo ao longo de anos, sempre com ideias boas e muita positividade.

Aos meus amigos que estão em Fortaleza Thiago Santos e Marcelo Teixeira, pela amizade ao longo de anos e os momentos de descontração.

Aos meus amigos que fiz em Belo Horizonte, Bruno Malacarne, Patrícia Duarte, Jéssica Fontana, Mayara Gomes, Letícia Cota, Maria Luiza, Cahuê Paz, Álvaro de Paula, Lucas Antunes, Jorge Tiburcio, Isabela Winter, Marina Alcântara, Marina Cunha, Camila Ferreira, Carlão, Guedes, João...por todos os momentos de descontração, presença e conselhos.

Ao Sr. João Chumbinho, uma pessoa excepcional que me acolheu em Belo Horizonte, sempre muito prestativo e alegre.

As pessoas que passaram na casa do Sr. João, em especial, Sidmar, Sara, Laura, Andrea, Andreas, Daniel, Marco Túlio, Letícia e Lara Cota e João Marcelo.

Agradeço a Deus e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse sonho.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

---

**SUMÁRIO**

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                  | <b>13</b> |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                   | <b>14</b> |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                        | <b>14</b> |
| 3.1. APOPTOSE.....  | 14        |
| 3.2. ANATOMOFISIOLOGIA .....                                | 16        |
| 3.3. METABOLISMO DAS CEBLs .....                            | 17        |
| 3.4. PATOFISIOLOGIA DA LAMINITE RELACIONADA À SEPSE.....    | 18        |
| 3.5. DEFINIÇÕES RELACIONADAS À SEPSE .....                  | 19        |
| 3.6. LAMINITE DE CARÁTER INFLAMATÓRIO .....                 | 21        |
| 3.7. MODELOS DE INDUÇÃO DE LAMINITE SÉPTICA .....           | 23        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                          | <b>24</b> |
| 4.1. MODELO DE LAMINITE POR EXTRATO DE NOGUEIRA PRETA (ENP) | 25        |
| 4.2. MODELO DE LAMINITE POR SOBRECARGA DE AMIDO (SCA) ..... | 25        |
| 4.3. DETECÇÃO DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA .....                  | 26        |
| 4.4. ANÁLISE DAS IMAGENS.....                               | 27        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>                                  | <b>27</b> |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                                   | <b>30</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>                                    | <b>32</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                  | <b>33</b> |

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1 - Índices (r) e seus respectivos valores de significância (P) das correlações entre as contagens de células apoptóticas com as contagens de leucócitos positivos para calprotectina (CP) e CD 163 nos modelos de laminite por extrato de noqueira preta (ENP) e excesso de amido (SCA)..... 30

---

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1** - Parede interna do casco mostrando a interdigitação das lamelas dérmicas epidérmicas e estruturas anexas (Pollitt, 2010). Esquema mostrando os feixes de colágeno partindo da falange distal à membrana basal. Note a disposição dos vasos sanguíneos apresentados apenas na região da derme. .... 17
- Figura 2** - Esquema ilustrando o equino com síndrome cólica onde ocorre a mudança de pH, pelo acúmulo de ácido láctico, na câmara fermentativa, levando a morte de microorganismos, em especial Gram-negativas, com lesão na mucosa do ceco e absorção de PAMPs e DAMPs, os quais vão ativar o sistema imune inato e degradar a membrana basal. .... 19
- Figura 3** - Esquema ilustrando no modelo de ENP como os animais foram alocados e o tempo de coleta das amostras lamelares no CON (3h), grupo PRE (1,5h), grupo DES (3-4h) e OG 1 (10-12h) .....25
- Figura 4** - Esquema mostrando no modelo de SCA como os animais foram alocados e os tempos de coleta de amostras lamelares. Grupo CON (24h), grupo DES (10-12h), coincidindo com o início da febre, grupo OG 1 (20-46h) representado pelo início da claudicação, e grupo OG 3 (48-72h), quando essa claudicação se torna evidente.....26
- Figura 5** - Fotomicrografia de tecido lamelar de equinos submetidos a modelo séptico de laminite. Marcação em marrom para TUNEL com contra coloração em verde metila. a) corte histológico do grupo DES do modelo de SCA com aumento de 10x. b) Ampliação de 40x demonstrando pontos difusos, indicando a formação dos corpos apoptóticos. c) Ampliação de 40x mostrando concreção concêntrica intensamente corada pela técnica de TUNEL, indicando início do processo apoptótico intranuclear. .... 28
- Figura 6** - Fotomicrografia de material processado pela técnica de TUNEL no modelo de extrato de noqueira preta. Todas as imagens estão com aumento de 20x. Imagem (A) mostrando o grupo CON que apresentam mais células TUNEL positivas. No grupo PRE, representado pela letra (B), há uma redução significativa de células TUNEL positiva. O mesmo ocorre no grupo DES, representado letra (C). na figura (D) demonstra que quase não houve apoptose. Setas vermelhas demonstram a formação de vacúolos de apoptose. Amostras processadas pela técnica de TUNEL no modelo de sobrecarga de amido estão identificadas pelas letras E (grupo CON), F (DES), G (grupo OG1) e H (grupo OG3). Note a marcação das células apoptóticas identificadas pela seta preta. .... 28
- Figura 7** - Médias e erros-padrão das contagens de células apoptóticas no tecido lamelar de equinos submetidos aos modelos de noqueira preta e excesso de amido para indução de laminite. Dentro de cada modelo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si. \* difere do mesmo grupo quando comparado ao outro modelo. .... 30

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**


---

|                |  |
|----------------|--|
| CEBL           | Célula epitélio basal lamelar                        |
| TUNEL          | TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling              |
| TFDP           | Tendão flexor digital profundo                       |
| TEDC           | Tendão extensor digital comum                        |
| MEC            | Matriz extracelular                                  |
| GLUT1          | Transportador de glicose 1                           |
| ATP            | Adenosina trifosfatada                               |
| PAMP           | Padrão molecular associado ao patógeno               |
| DAMP           | Padrão molecular associado ao dano                   |
| SIRS           | Síndrome da resposta inflamatória sistêmica          |
| CARS           | Síndrome da resposta antiinflamatória compensatória  |
| LPS            | Lipopolissacarideo                                   |
| RNA            | Ácido ribonucleico                                   |
| IL-1 $\beta$   | Interleucina 1 $\beta$                               |
| ICAM1          | Molécula de adesão intercelular 1                    |
| CXCR1          | Receptor de quimiocina 1                             |
| CXCR2          | Receptor de quimiocina 2                             |
| CXCL6          | Receptor de quimiocina 6                             |
| CXCL8          | Receptor de quimiocina 8                             |
| MMP-2          | Matriz metaloproteína 2                              |
| MMP-9          | Matriz metaloproteína 9                              |
| CD163          | Grupo de diferenciação 163                           |
| DNA            | Ácido desoxirribonucleico                            |
| TNF            | Fator de necrose tumoral                             |
| ENP            | Extrato de noqueira preta                            |
| CON            | Controle   |
| PRE            | Precoce  |
| DES            | Desenvolvimento                                      |
| SCA            | Sobrecarga de amido                                  |
| MAC387         | Anticorpo marcador de macrófago 387                  |
| CP             | Calprotectina  |
| DAB            | Diaminobenzidina associada ao peróxido de hidrogênio |
| TdT            | Desoxinucleotidil transferase                        |
| IIS            | Imagem inteira de slide                              |
| LDP            | Lamela dérmica primária                              |
| LDS            | Lamela dérmica secundária                            |
| LE             | Laminas epidérmicas                                  |
| RLOs           | Radicais livres de oxigênio                          |
| AP-1           | Proteína ativadora 1                                 |
| SOFA           | Avaliação de falha de órgãos sequenciais             |
| NF- $\kappa$ B | Fator nuclear kappa B                                |
| AIP            | Proliferação induzida por apoptose                   |
| ATP            | Trifosfato de adenosina                              |

## RESUMO

O complexo processo de morte celular programada (apoptose) é um mecanismo, onde células participam ativamente, com produção de caspases em resposta a uma gama de estímulos, contrabalanceando a mitose ou buscando a homeostase. No entanto, quando ocorre de forma exacerbada, na interface lamelar, em pacientes com laminite aguda ou crônica, contribui com a falha nas estruturas de suporte e aderência da falange distal ao estojo córneo. O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência de apoptose nos modelos de extrato de noqueira preta e sobrecarga de amido, utilizando a técnica de TUNEL, e correlacionar com achados de neutrófilos e monócitos nos diferentes estágios de desenvolvimento da laminite em ambos os grupos. Para tanto foram utilizados 20 animais no modelo de extrato de noqueira preta alocados igualmente nos grupos Controle (CON = 5), Precoce (PRE = 5), Desenvolvimento (DES = 5) e grau de Obel 1 (OG 1 = 5). Quanto ao modelo de sobrecarga de amido, foram utilizados 25 animais alocados nos grupos Controle (CON = 8), Desenvolvimento (DES = 6), grau de Obel 1 (OG 1 = 6) e grau de Obel 3 (OG 3 = 5). As amostras foram tratadas e processadas para a técnica de TUNEL de apoptose e imunohistoquímica para neutrófilos e monócitos. Os modelos de laminite por extrato de noqueira preta e sobrecarga de amido produzem efeitos diferentes sobre a ocorrência de apoptose nos queratinócitos do tecido lamelar, havendo redução durante o desenvolvimento e início de claudicação no modelo ENP. Esse por sua vez, apresentou uma correlação negativa entre apoptose e infiltração leucocitária, demonstrando que ocorre concomitante aumento de infiltrado leucocitário com redução na ocorrência de apoptose no tecido lamelar, sugerindo um potencial efeito citoprotetor do extrato de noqueira preta.

Palavras chave: laminite, inflamação, apoptose, equino, sepsis.

## ABSTRACT

*The process of programmed cell death (apoptosis) is a mechanism where cells actively participate, producing caspases in response to a range of stimuli, counterbalancing mitosis or seeking homeostasis. However, when it occurs exacerbated, in a lamellar interface, in patients with acute or chronic laminitis, with a failure in support structures and adherence of the phalanx distal to the hoof. The objective of this work was to verify the occurrence of apoptosis in black walnut extract (BWE) and starch overload (CHO) models using the TUNEL technique and to correlate with findings of neutrophils and monocytes in the different stages of development of laminitis in both groups. For this purpose, 20 animals were used in the model of black walnut extract equally allocated in the groups Controls (CON = 5), Earlier Time Point (ETP = 5), Later Time Point (DTP = 5) and Obel 1 (OG 1 = 5). As for the starch loading model, 25 animals were allocated to the Control (CON = 8), Later Time Point (DTP = 6), Obel 1 (OG 1 = 6) and Obel 3 (OG 3 = 5). The samples were treated and processed for the TUNEL technique of apoptosis and immunohistochemistry for neutrophils and monocytes. The models of laminitis by black walnut extract and starch overload produce different effects on the occurrence of apoptosis in lamellar tissue keratinocytes, with reduction during development and onset of claudication in the BWE model. This, in turn, presented a negative correlation between apoptosis and leukocyte infiltration, demonstrating that concomitant increase of leukocyte infiltrate occurs with reduction in the occurrence of apoptosis in the lamellar tissue, suggesting a potential cytoprotective effect of black walnut extract.*

*Keywords: laminitis, inflammation, apoptosis, equine, sepsis.*

## 1. INTRODUÇÃO

O casco do equino é uma estrutura complexa da engenharia natural, construída para resistir a forças acentuadas e capaz de se adaptar a uma gama surpreendente de condições ambientais. De forma extremamente resiliente, tal estrutura muda diariamente, para melhor ou pior, em resposta ao contínuo fluxo de fatores externos e internos (Kauffmann e Cline, 2017).

Assim, o esqueleto apendicular possui estruturas funcionais capazes de realizar um único e essencial papel que é promover a sustentação da falange distal. Essa sustentação depende não somente da conexão das células epiteliais basais lamelares (CEBLs) com a derme, mas também da capacidade de todo o tecido dérmico e epidérmico em manter sua morfologia na presença de um grande estresse físico (Lane et al., 2017). Uma vez perdida a integridade dessas estruturas, o resultado catastrófico é o deslocamento da falange distal, que eventualmente afunda e/ou rotaciona em seu eixo transversal chegando, em casos mais graves, a perfurar a sola queratinizada do estojo córneo (Leise, 2018).

Diante disso, a laminite se apresenta como uma enfermidade quase sempre secundária à doença prévia, acometendo o dígito do equino e resultando na falência estrutural do mecanismo de aderência do estojo córneo ao esqueleto apendicular (Eades, 2010; Noschka et al., 2009; Pollitt e Visser, 2010). Como consequência dessa afecção, a dor e a perda da função locomotora acarretam sequelas ainda piores, podendo culminar com a morte (Belknap et al., 2007; Loftus et al., 2007). Contudo, mais que uma única entidade patológica, a laminite pode ser melhor considerada como uma síndrome, em virtude de múltiplas causas de incitamento e, possivelmente, múltiplas vias fisiopatológicas (Harris, 2012).

Embora várias hipóteses tenham sido postuladas quanto a fisiopatologia da laminite, de modo geral ela é considerada uma doença que envolve disfunção vascular com produção local excessiva de mediadores inflamatórios (Belknap et al., 2007), revelando um cenário onde a lesão remota tem como alvo as lamelas do casco do equino. A expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de superfície celular, moléculas de sinalização e enzimas sugerem que produtos originados de diferentes compartimentos celulares desempenham papéis importantes na mediação da resposta durante o curso da doença (Noschka et al., 2009).

A expressão de mediadores inflamatórios pode estar envolvida no mecanismo de morte celular programada (apoptose), seguindo na ativação de vias de sinalização específicas, reguladas geneticamente, que culminam na deleção de células do tecido, visto que esta se encontra aumentada em casos de laminite aguda e crônica (Faleiros et al., 2004).

A grave condição observada comumente em equinos acometidos se manifesta com doloroso e intenso desconforto. Um reflexo das alterações do casco, que muitas vezes comprometem o retorno as atividades físicas, uma vez que a falha no tratamento é responsável por numerosos casos de eutanásia (Laskoski et al., 2016).

Embora a literatura discorra sobre apoptose como sendo um evento que promove proteção do organismo, este tipo de morte celular também pode participar do processo patológico juntamente com a necrose. Estudos prévios demonstram sua ocorrência na fase aguda da laminite clínica, em animais que evoluíam para rotação de falange (Faleiros et al., 2004). Entretanto, os estudos ainda são escassos e sua participação no início dos sintomas, quando a inflamação se encontra em sua fase mais exuberante, ainda não está estabelecida. Portanto, esse estudo buscou evidenciar sua participação desde a fase desenvolvimento até o início da claudicação, em equinos submetidos a modelos de laminite por extrato de noqueira preta e sobrecarga de amido.

## 2. OBJETIVOS

Verificar e comparar a ocorrência de apoptose no tecido lamelar de equinos submetidos aos modelos de extrato de noqueira preta e sobrecarga de amido, utilizando a técnica de TUNEL, e correlacionar com a infiltração tecidual de neutrófilos e monócitos lamelares no estágio de desenvolvimento e no início da fase aguda da laminite em ambos os grupos.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. APOPTOSE

Danos no DNA não resolvidos podem prejudicar tanto a função celular, quanto promover o desenvolvimento de doenças, assim como, acelerar o envelhecimento. Para evitar tais consequências indesejadas, as células são equipadas com uma variedade de mecanismos de reparo de DNA. No entanto, esses mecanismos não são perfeitos. Quando o reparo é insuficiente, a integridade do tecido ainda é, pelo menos inicialmente mantida por mecanismos independentes de resposta ao estresse (Keizer, 2017).

Assim, duas formas distintas de morte celular têm sido reconhecidas: necrose e apoptose, onde ambas podem ocorrer de forma independente, sequencial e simultânea. A necrose que já foi cogitada ser a forma universal de morte celular, atualmente é vista como a consequência de grandes insultos envolvendo o ambiente celular. Ao contrário, a apoptose ocorre também em condições fisiológicas, quando a morte é programada (Schwarz et al., 1995). Em alguns casos, é o tipo de estímulo e / ou o grau do mesmo que determina se as células morrem por apoptose ou necrose. Em doses baixas, uma variedade de estímulos prejudiciais, como calor, radiação, hipóxia e drogas citotóxicas, podem induzir a apoptose, mas esses mesmos estímulos podem resultar em necrose quando expostos a dosagens mais elevadas (Elmore, 2007).

A alternativa à morte celular por apoptose, ou seja, a necrose, é considerada um processo tóxico em que a célula é uma vítima passiva e segue em sua morte de forma independente de gasto de energia (Elmore, 2007). Como um suicídio ativo, a apoptose manifesta-se como um mecanismo encontrado em muitos tecidos pelo quais as células desvitalizadas são eliminadas de maneira ordenada. Para que o processo ocorra, a síntese de proteínas e a ativação de quinases chamadas “caspases” são necessárias, além de estímulos menos patológicos ou suplementares, que muitas vezes, por si só, não poderiam causar a morte celular (Olson e Everett, 1975; Schwarz et al., 1995). Embora os mecanismos e morfologias de apoptose e necrose sejam diferentes, há sobreposição entre esses dois processos. Ambas apresentam expressões morfológicas de uma rede bioquímica compartilhada, descrita como o “contínuo de apoptose-necrose” (Zeiss, 2003). Assim, dois fatores que irão converter um processo apoptótico em andamento em um processo necrótico são a redução na disponibilidade de caspases e ATP intracelular (Elmore, 2007). Se uma célula morre por necrose ou apoptose depende em parte da natureza do sinal de morte celular, do tipo de tecido, do estágio de desenvolvimento do tecido e do meio fisiológico (Zeiss, 2003).

Duas vias estão envolvidas na indução de apoptose, um iniciador de receptor de morte, mediado pela via da caspase-8 (conhecida como extrínseca) e a iniciação mitocondrial mediada pela caspase-9 (conhecida como intrínseca). As proteases da morte - caspases iniciadoras e efetoras, são sintetizadas como zimogênios inativos e ativadas por multimerização e clivagem proteolítica (Fogarty e Bergmann, 2017). Ambas as vias convergem para ativar a caspase-3, a qual é essencial para protease apoptótica no final comum para a morte celular programada. A caspase-8 pode ser ativada por vários ligantes em diferentes receptores, bem como por outros mecanismos, incluindo Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o qual é a chave para o aumento de citocinas em pacientes com sepsis. A via mitocondrial pode ser ativada por uma grande variedade de estímulos, incluindo radicais livres de oxigênio (ROS), produto da migração de neutrófilos (Hotchkiss e Nicholson,

2006). Uma vez iniciado o complexo para clivagem da caspase-3 ocorre a fragmentação do DNA, degradação das proteínas nucleares e do citoesqueleto, reticulação de proteínas, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para receptores celulares fagocíticos e, finalmente, captação por fagocitose.

As caspases são amplamente expressas em uma forma pró-enzima inativa na maioria das células e uma vez ativada, pode ativar outras pró-caspases, permitindo o início de uma cascata de proteases, podendo algumas pro-caspases se agregar e autoativar. Essa cascata proteolítica, na qual uma caspase pode ativar outras caspases, amplifica a via de sinalização apoptótica e, assim, leva à rápida morte celular, através da clivagem de proteínas em resíduos de aminoácidos (Elmore, 2007).

Deste modo, as alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a morte celular programada e certos processos patológicos seguem etapas essenciais. Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças ambientais (Kerr, 1995; Kerr, 2002).

Contudo, a apoptose é um mecanismo que contrabalança a mitose na manutenção da homeostase de tecidos, uma vez que o equilíbrio deve existir entre mitose e morte celular, para manter as populações celulares (Olson e Everett, 1975). Assim, por expressões genéticas rigidamente controladas, decorrentes da interação célula e meio ambiente, quando eventos perturbam a homeostase, em resposta à injúria com consequente ativação do sistema imune inato e adaptativo, leva à produção de diversas moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfologicamente por condensação e fragmentação cromatínica (Anazetti e Melo, 2007).

No entanto, as vias de sinalização dependentes de caspases, iniciam um papel fundamental na cicatrização e regeneração de feridas. Além disso as caspases apoptóticas podem contribuir para o início da formação de tumor, a inflamação dependente de caspases e a proliferação induzida por apoptose (AIP). Essa última, é o termo designado que reflete uma proliferação compensatória, especificamente desencadeada pelo complexo de apoptose. AIP não é uma via única, mas abrange uma variedade de cascatas de sinalização pelas quais as caspases promovem a proliferação não autônoma através da secreção de mitógenos, muitas vezes em paralelo, mas independente da execução final da morte celular por apoptose (Fogarty e Bergmann, 2017).

Sob certas circunstâncias, as caspases podem sinalizar às células imunes que contribuem para a proliferação sustentada durante a AIP. Em tecidos epiteliais, a ativação de iniciadores de caspases desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio extracelulares (eROS) através da NADPH oxidase Duox2. Isso promove o recrutamento de células imunológicas para locais de cicatrização de feridas, onde através de uma reação inflamatória, que envolve a produção de ROS e sinalização para TNF, culmina em apoptose (Fogarty e Bergmann, 2017). Após o processo com formação dos corpos apoptóticos, macrófagos realizam fagocitose dos restos celulares, com a expressão e reconhecimento prévio de marcadores de superfície celular, prevenindo a liberação de proteínas que possam levar dano aos tecidos (Brinkmann e Zychlinsky, 2007).

Visto que a laminite, na fase prodromal, está associada com a resposta inflamatória com elevação de diversos mediadores inflamatórios, esta característica nem sempre se associa com a apoptose (Laskoski et al., 2010). A compreensão de qual via particular está envolvida na apoptose induzida pela sepse é importante porque pode fornecer uma visão dos potenciais fatores responsáveis por iniciar o suicídio celular e permitir uma terapia direcionada (Hotchkiss e Nicholson, 2006). Além disso, a apoptose pode levar ao enfraquecimento das lamelas do casco, pois a morte de queratinócitos contribui para a falha lamelar (Faleiros et al., 2004). Outro processo importante é mudança do fenótipo celular, de uma célula epitelial para mesenquimal, com elevação da taxa de

mitose, contribuindo para a desregulação do citoesqueleto e dificultando a interação das lamelas dermo-epidérmicas (Lane et al., 2017). Acreditamos que tal processo pode desencadear a AIP, conduzindo para a formação da cunha lamelar e o efeito catastrófico do desarranjo das estruturas de conexão da interface lamelar.

### 3.2. ANATOMOFISIOLOGIA

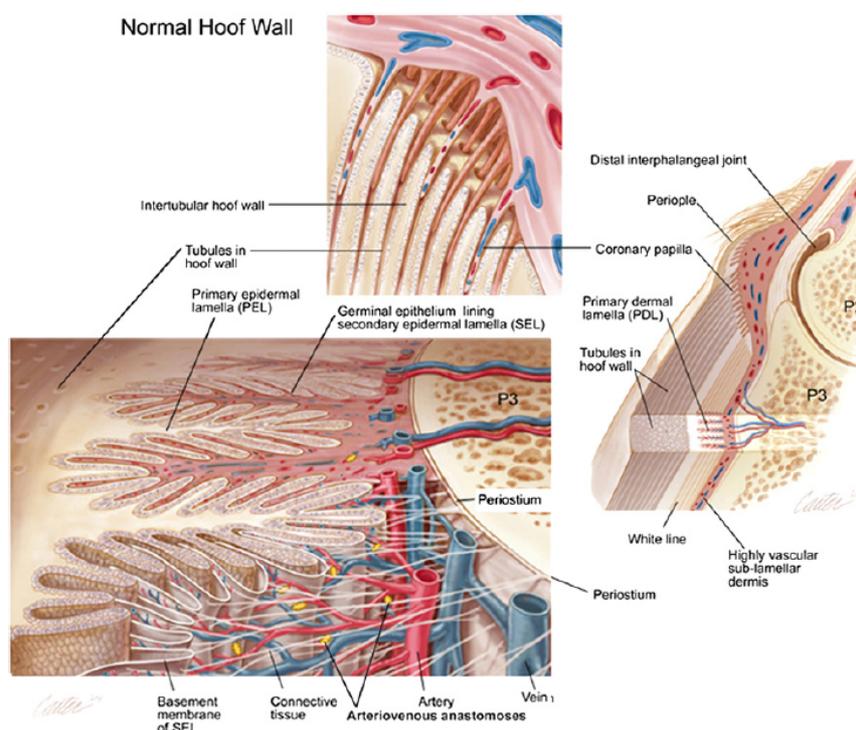
O casco do equino é composto basicamente de epiderme (estojo córneo ou cápsula do casco), derme (incluindo tecido conectivo, vasos sanguíneos e nervos), ossos e cartilagens. Contudo, tais estruturas são dispostas de forma extremamente complexa e eficiente, para amortecer o impacto do apoio do cavalo com o solo e transformar a energia gerada em movimento (Parks, 2017).

O estojo córneo consiste de três camadas, sendo elas estrato externo, médio e interno. O estrato externo é representado por uma delgada camada denominada perióplio. O estrato médio é composto por túbulos e intertúbulos, que representam a camada mais espessa, enquanto o estrato interno é formado pelas células epidermais, configurando as lamelas epidermais primárias e secundárias, com um eixo queratinizado (Pollitt, 2010).

Segundo Leach (1980), a parede do casco cresce ao longo da vida do equino para substituir o tecido perdido pelo desgaste com a superfície do solo. A regeneração é contínua na região coronária, onde há células germinativas (células epiteliais basais) que produzem populações de células jovens (queratinócitos ou células produtoras de queratina), as quais irão amadurecer e queratinizar constantemente.

O esqueleto apendicular é suspenso dentro do estojo córneo por uma estrutura anatômica, que vem sendo denominada como aparato suspensor da falange distal (Pollitt e Collins, 2016). Internamente ao estojo córneo se encontram parte da falange média, a falange distal e o osso navicular, os quais se articulam entre si. A falange distal é o osso que se conecta com o estojo córneo. Em sua superfície parietal existem ranhuras, onde a derme profunda se insere, e canais para a passagem de vasos sanguíneos que irão suprir o estrato lamelar. Além dessa conexão, a falange distal se distingue pela inserção do tendão flexor digital profundo (TFDP), que se insere em sua superfície solear, e pela inserção do tendão extensor digital comum (TEDC), que ocorre em seu ápice dorsal, no chamado processo extensor (Parks, 2017). De modo complementar, o TFDP, além de sustentar a falange distal, participa do amortecimento das vibrações, ao passo que o arranjo de veias e vênulas, por meio de mecanismo hidráulico e propriedades viscoelásticas, reduzem o efeito do impacto do membro ao solo (Bowker et al., 1998).

O osso navicular (sesamóide distal) é coberto por cartilagem hialina na sua superfície dorsal, onde se articula com as falanges média e distal ao nível da articulação interfalangeana distal. Enquanto que a superfície palmar configura-se como fibrocartilagem, que facilita o deslizamento do TFDP (Parks, 2017). A estabilidade lateromedial da articulação interfalângica distal é conferida pela ação de ligamentos colaterais, enquanto o sesamóide distal se sustenta pelos ligamentos suspensórios e pelo o ligamento ímpar, mantendo a posição desse osso no aspecto palmar das falanges média e distal (Parks, 2017).



**Figura 1** - Parede interna do casco mostrando a interdigitação das lamelas dérmicas epidérmicas e estruturas anexas (Pollitt, 2010). Esquema mostrando os feixes de colágeno partindo da falange distal à membrana basal. Note a disposição dos vasos sanguíneos apresentados apenas na região da derme.

Mediante a membrana basal, as lamelas epiteliais do estojo córneo estão intimamente ligadas às lamelas dermais, de modo complementar e harmônico, formando uma estrutura que é componente integral do aparato suspensório da falange distal. Esta ligação ocorre por interdigitação de lamelas primárias e secundárias que ampliam a área de contato entre derme e epiderme. As lamelas possuem diversas proteínas, dentre elas integrinas, que vão promover a fixação da falange distal ao estojo córneo, por meio de uma rede de colágeno que lança seus feixes firmemente anexados, à superfície parietal da falange distal, à membrana basal (Pollitt, 2010) (Figura 1).

Como principal função das integrinas, a promoção da adesão celular à matriz extracelular (MEC) é realizada pela ligação específica de dímeros  $\alpha\beta$  às proteínas da MEC, como fibronectina, vitronectina e colágeno (Hynes, 2002). Elas possuem um extenso domínio extracelular que serve de ligação com uma cauda citoplasmática mais curta, interagindo com várias camadas de proteínas e moléculas de sinalização. Determinantemente, as caudas citoplasmáticas estão fisicamente ligadas a componentes do citoesqueleto, incluindo filamentos de actina e filamentos intermediários, proporcionando assim uma ancoragem mecânica entre a matriz extracelular e a célula (Hynes, 2002).

As células epiteliais basais lamelares (CEBLs) se conectam à membrana basal por hemidesmossomos, constituídos por proteínas de ancoragem que se ligam a filamentos intermediários do citoesqueleto da CEBL. As lamelas epidermais são ricas em filamentos intermediários de queratina, que promovem a sustentação do núcleo das CEBLs e servem de ponto de ancoragem para coadunar com células parabasais pela ação de desmossomos. Também atuam nessa união as junções de aderência, que ligam uma célula epidermal a outra com o auxílio do conjunto de filamentos de actina (Pollitt, 2010).

### 3.3. METABOLISMO DAS CEBLs

Os carboidratos, especialmente, a glicose são as principais fontes de energia para células eucariontes. Como os equinos são animais capazes de realizar tanto a digestão enzimática quanto

a microbiana, a digestão de carboidratos não estruturais ocorre principalmente no intestino delgado, sugerindo que os açúcares possam ser utilizados diretamente do alimento (Wattle e Pollitt, 2004).

Supostamente, as CEBLs continuamente absorvem glicose do fluido extracelular adjacente que é entregue através de vasos sanguíneos na derme lamelar. Desta forma, as lamelas se assemelham ao tecido cerebral que depende do transportador de glicose 1 (GLUT1) para a captação de glicose independente da insulina (French e Pollitt, 2004).

Assim, as CEBLs são metabolicamente ativas e consomem energia para seu papel fundamental que é a manutenção do aparato suspensório da falange distal. Para tanto, elas necessitam de uma demanda de glicose elevada, uma vez que a redução, ou mesmo, ausência do fornecimento de glicose, promove a retração e desaparecimento de hemidesmossomos, além de desagregação do citoesqueleto, mudando a forma do núcleo celular de fusiforme para redondo (French e Pollitt, 2004).

Estudos indicam que os cascos, apesar de representarem cerca de 1% do peso corpóreo do equino, podem consumir até 15% de glicose arterial, enquanto o cérebro consome apenas 8% do que é entregue (Wattle e Pollitt, 2004). Destaca-se também o fato de sua baixa capacidade de armazenamento de glicogênio, quando comparado com a musculatura estriada, uma vez que o casco é formado basicamente por epiderme, derme e cartilagem (Wattle e Pollitt, 2004).

A alta demanda de glicose parece também estar relacionada ao fato das CEBLs e das células epidermais parabasais não receberem aporte sanguíneo direto, pois não existem vasos nas camadas epidermais. Tais células vivem assim em um meio de relativa hipóxia e apresentam pequena quantidade de cristas mitocondriais, tornando-as pouco eficientes para produção de ATPs através da fosforilação oxidativa, que implica em alto consumo de glicose e produção de lactato (Pollitt, 2017). Talvez por isso, os tecidos lamelares possuam pequena quantidade da enzima superóxido desmutase, a qual é um catalizador crítico para a neutralização de espécies reativas de oxigênio (Hurley et al., 2011).

O lactato que é um produto da glicólise anaeróbica, frequentemente tem sido considerado como um produto final do metabolismo. Contudo, sob condições aeróbicas, o lactato pode entrar no ciclo do ácido cítrico via piruvato e, assim, ser usado para produção de ATP. Seguindo essa rota, o lactato deixa de ser um produto residual e passa a ser considerado intermediário metabólico, que sob condições aeróbicas pode contribuir para produção de energia em diversos órgãos (Brooks et al., 1999; Schurr et al., 2001).

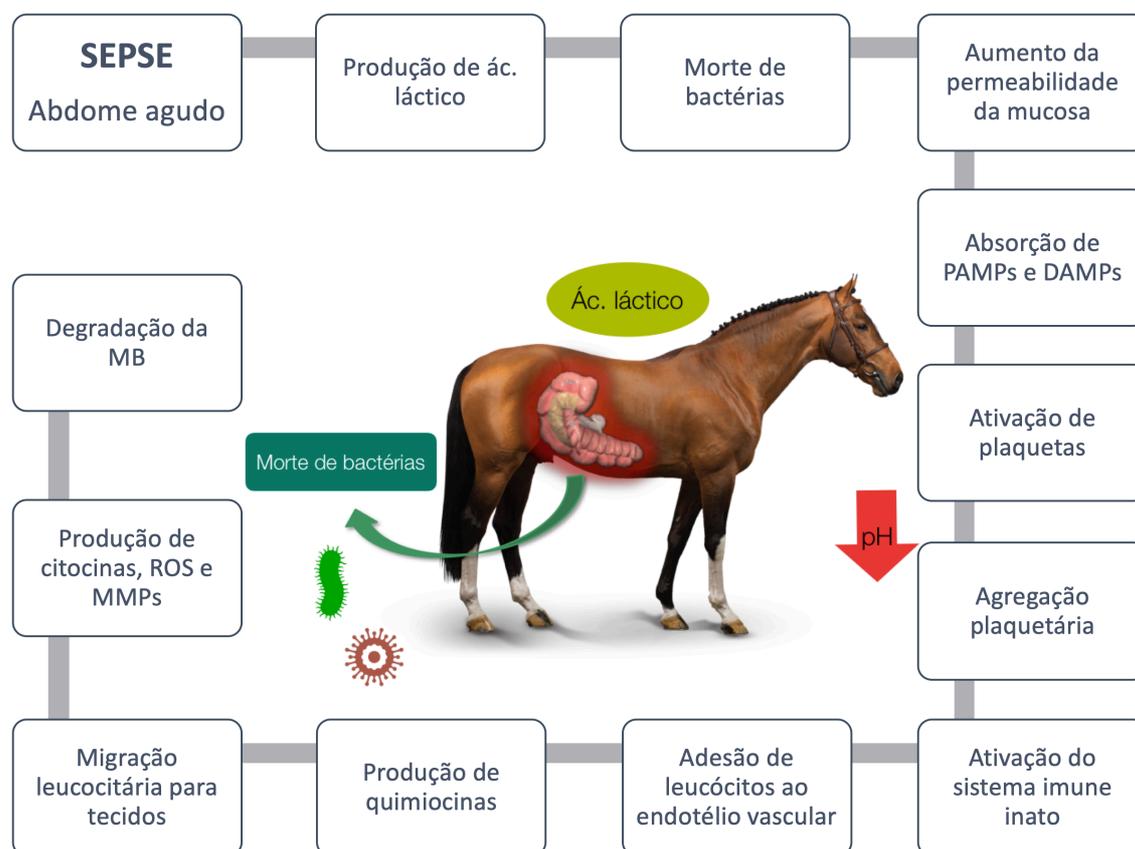
### 3.4. PATOFISIOLOGIA DA LAMINITE RELACIONADA À SEPSE

Embora os cascos dos equídeos estejam adaptados às exigências do meio externo, a destruição de sua microestrutura pelo processo patológico da laminite tem consequências desastrosas para a sobrevivência do indivíduo acometido. Assim, a perda da integridade da junção dermo-epidérmica, resulta na falta de conexão do casco ao esqueleto, permitindo variados graus de deslocamentos entre o estojo córneo e a falange distal, com incapacidade de sustentação do peso e de locomoção. A dramática condição expressada por intenso desconforto podal, claudicação, dificuldade de se manter na posição quadrupedal e as alterações no casco, revelam a gravidade da doença, mas não os mecanismos pelos quais levam a esta conjuntura (Laskoski et al., 2016).

A fase prodrômica inclui o desenvolvimento de lesões no tecido lamelar do casco, apresentando sinais clínicos sutis, como aumento do pulso digital e alterações associadas à sepsse como membranas mucosas congestionadas, taquicardia, aumento do tempo de enchimento capilar, anorexia, hipertermia e redução da motilidade intestinal (Pollitt, 1999).

Diante disso, as células lamelares normais possuem único e importante papel, que é o desafio de promover a sustentação da falange distal. Essa sustentação depende não somente da aderência das CEBLs com a derme, mas também da capacidade celular de manter sua morfologia na presença de um grande estresse físico (Lane et al., 2017). Assim, uma regulação fisiológica das células epiteliais, particularmente a expressão de proteínas de adesão, responsáveis por unir as células epiteliais umas às outras, é provavelmente um fator muito importante na dinâmica de estruturas, que podem sofrer desmontagem, quando diferentes mecanismos de sinalização são ativados (Belknap e Black, 2012).

Assim, devido à origem multifatorial e quase sempre secundária a outras afecções, um exemplo claro de causa de laminite é a síndrome cólica, onde observa-se intensa produção de ácido láctico no ceco e cólon maior, o qual reduz o pH intestinal, promove a morte de bactérias, em especial Gram negativas, e aumenta a permeabilidade da mucosa (Figura 2). Com isso, a inevitável absorção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e outros metabólitos bacterianos, subsequentemente representam um potencial perigo para o estrato lamelar (Pollitt, 1999).



**Figura 2** - Esquema ilustrando o equino com síndrome cólica onde ocorre a mudança de pH, pelo acúmulo de ácido láctico, na câmara fermentativa, levando a morte de microorganismos, em especial Gram-negativas, com lesão na mucosa do ceco e absorção de PAMPs e DAMPs, os quais vão ativar o sistema imune inato e degradar a membrana basal.

### 3.5. DEFINIÇÕES RELACIONADAS À SEPSE

Assim como em humanos, a sepse sistêmica, comumente denominada por endotoxemia, pode ocorrer nos equinos acometidos por diversas doenças, tal como enterocolites, pleuropneumonia e endometrite. Apesar dos avanços substanciais no tratamento da sepse, esta continua como uma das principais causas de doença e mortalidade em equinos, sendo também considerada um fator de risco para o desenvolvimento da laminite (Leise, 2018). Deste modo, o termo endotoxemia é

comumente usado para descrever o estado clínico de equinos, em que a função do sistema circulatório e a perfusão tecidual estão comprometidos (Moore e Vandenplas, 2014).

A inflamação sistêmica em resposta a invasão de metabólitos microbianos pode levar a rápida deterioração, apesar do controle do patógeno, o que representa um desafio para os médicos veterinários que lidam com o problema (Taylor, 2015). Diante da dificuldade, o American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine publicou um relatório de consenso de definições adotadas em 1992, para fornecer precisão e consistência entre os profissionais, utilizando variáveis clínicas facilmente mensuráveis e acessível, como passo inicial para a problemática (Bone *et al.*, 1992). Assim, o diagnóstico era baseado na definição do termo síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), a qual é usado para descrever a resposta do corpo quanto a inflamação sistêmica que pode ser causada por agentes infecciosos (bactérias, fungos, vírus etc.) e não infecciosas (traumatismos, queimaduras, toxinas, acidose etc.), gerando evidências de disfunção e falência de órgãos (Moore e Vandenplas, 2014; Taylor, 2015). Assim, quando a SIRS é resultado de uma infecção, ela é denominada sepse (Taylor, 2015). Para tanto, os parâmetros hipertermia ou hipotermia, taquicardia, taquipnéia ou hiperventilação, leucopenia, leucocitose ou mais que 10% de neutrófilos imaturos, eram utilizados como ferramenta de diagnóstico, uma vez que o paciente apresenta-se 2 dessas características (Bone *et al.*, 1992). No entanto, profissionais da área, principalmente veterinários de equinos, não aderiram aos critérios referenciados. Assim, relatórios subsequentes foram publicados até que em 2016 a Sociedade de Medicina e Cuidados Críticos, juntamente com a Sociedade Européia de Medicina e Cuidados Críticos, propuseram uma nova definição de sepse (Marik e Taeb, 2017).

Embora esses parâmetros sejam inespecíficos, os critérios SIRS não se aplicam quando outras causas não-inflamatórias desses sinais clínicos estão presentes, como dor, estresse por calor ou quimioterapia (Bone *et al.*, 1992). No entanto, o diagnóstico definitivo de sepse bacteriana é obtido através da cultura microbiana e infelizmente, os resultados não são obtidos em menos de 48 horas e, conseqüentemente, o tratamento empírico é frequentemente instituído antes do diagnóstico (Taylor, 2015).

Outras definições foram sugeridas, como uma complicação frequente da SIRS manifestada pela disfunção sistêmica de órgãos denominada síndrome da disfunção múltipla de órgãos (MODS), revelando um cenário onde a restauração da homeostase não ocorre sem que haja uma intervenção. Para contrabalancear a resposta pró-inflamatória e interromper a SIRS, o hospedeiro conta com oposição anti-inflamatória que inclui produção de citocinas, receptores de citocinas solúveis, antagonistas de receptores, prostaglandina E2 e corticosteroides (Barton e Peroni, 2018). Caso haja um recrutamento excessivo dos processos anti-inflamatórios, um estado de anergia, levando a imunossupressão, aumento da suscetibilidade à infecção e incapacidade de reparar os tecidos danificados é evidenciado. Esse cenário é chamado de síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS) (Taylor, 2015).

Assim, o choque representa a progressão de uma cascata de eventos que começa quando as células ou tecidos são privados de uma fonte de energia adequada devido à privação de oxigênio. Deste modo, o desequilíbrio na manutenção das funções fisiológicas resulta na perfusão tecidual inadequada com fornecimento de energia inadequado, levando ao acúmulo de produtos residuais e à falha de funções dependentes de energia, assim como, à liberação de enzimas celulares e ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (RLOs), culminando em lesão celular e, finalmente, morte celular. A ativação das cascatas inflamatórias, de coagulação e do complemento resulta em lesão celular adicional e trombose microvascular. A amplificação desses processos juntamente com o aumento da absorção de endotoxina e bactérias (como resultado de disfunção hepática e gastrointestinal) leva à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), disfunção de múltiplos órgãos (MOD) e, se não controlada, finalmente a morte (Mitchell e Schoster, 2018).

Considerando que, nos humanos, a SIRS é o retorno de eventos patofisiológicos complexos, que se desenvolve após uma variedade de insultos graves e agudos, resultando na falência de órgãos, como o fígado e pulmão, nos equinos, as lamelas são um alvo primário para o indivíduo que sofre de sepse. Tanto no homem quanto no equino, as consequências da sepse surgem como sequelas tardias de doenças microbianas (Belknap e Black, 2012).

Contudo, os critérios de SIRS foram confrontados com uma nova forma de avaliação para definição do paciente com sepse, visando resultados mais precoces e fidedignos. A avaliação de falha de órgãos sequenciais (SOFA) mostrou ter uma validade preditiva melhor que os critérios adotados pelo SIRS (Seymour et al., 2016; Singer et al., 2016). Além disso, os critérios da SIRS estão presentes em muitos pacientes hospitalizados, incluindo aqueles que nunca desenvolvem infecção e nunca incorrem em resultados adversos (Marik e Taeb, 2017).

Embora o uso do escore de SOFA seja comumente usado na clínica em algumas unidades de terapia intensiva (UTI) para humanos, constituindo uma ferramenta rotineira de coleta de dados para avaliações clínicas, o instrumento é dotado de complexidade que muitas vezes peca com identificação tardia do paciente em risco. Assim, reconhecendo essas limitações práticas, um novo teste adaptado foi desenvolvido, SOFA rápido, simplificando o método anterior, para facilitar a identificação de pacientes potencialmente em risco de morte por sepse (Seymour et al., 2016; Singer et al., 2016).

### 3.6. LAMINITE DE CARÁTER INFLAMATÓRIO

Durante muito tempo, em virtude da falta de evidências que comprovasse o processo inflamatório, tal característica era negligenciada, quanto a compreensão da fisiopatogenia da laminite. Atualmente, as pesquisas se concentram em evidências fisiopatológicas, no início do desenvolvimento da laminite, focadas no processo inflamatório, incluindo migração e ativação de leucócitos e principalmente nos casos relacionados a sepse ou SIRS (Leise, 2018).

Como a primeira linha de defesa contra microrganismos, o sistema imune inato está presente em todos os indivíduos e responde rapidamente ao patógeno, na maioria das vezes em minutos. Em grande parte dos casos essa resposta é suficiente para debelar a invasão dos patógenos aos tecidos. No entanto, o sistema imune inato não fornece memória de longo prazo ou especificidade seletiva contra patógenos, sendo essa especificidade deixada para o sistema imuno adaptativo (Moore e Vandenplas, 2014).

Assim, tão rápido quanto responder à insultos, o sistema imunológico inato conta com uma fonte de mediadores inflamatórios que resultam em SIRS. O objetivo desses fatores é eliminar os patógenos ou mesmo os atenuar, de modo a reduzir a probabilidade de que eles estabeleçam uma infecção ativa. Esses fatores incluem enzimas, tais como a lisozima, que digerem as paredes celulares bacterianas, o sistema do complemento que identifica e alveja patógenos para lise e fagocitose, e peptídeos antimicrobianos que causam a lise direta das membranas celulares bacterianas (Moore e Vandenplas, 2014).

Um componente de ação mais lenta do sistema imune inato é o reconhecimento de moléculas microbianas, chamadas de PAMPs por receptores celulares. Os mais notáveis desses PAMPs são as endotoxinas (isto é, os lipopolissacarídeos [LPS]), a flagelina, o peptidoglicano, o ácido lipoteicóico e o RNA viral de fita dupla). A ligação destes PAMPs aos seus respectivos receptores resulta na ativação das células e no início de respostas adicionais projetadas para combater os patógenos e eliminá-los do corpo. A natureza crítica do sistema imune inato é exemplificada pelos efeitos deletérios de anormalidades genéticas que resultam na ausência ou disfunção de um ou mais componentes do sistema (Werners e Bryant, 2012).

Deste modo, uma vez ocorrido a absorção dos PAMPs e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), os quais são liberados por células lesadas durante o trauma, o organismo se limita

manifestando-se através de uma intensa resposta inflamatória. Estudos sugerem que a baixa quantidade de LPS não é capaz de ativar leucócitos diretamente, porém essas quantidades poderiam ser suficientes para ativar plaquetas, que são consideravelmente mais sensíveis a endotoxinas (Bailey et al., 2009; Li et al., 2015).

As respostas imunes inatas à infecção são mediadas por classes distintas de receptores expressos na superfície das células ou em compartimentos intracelulares. Contudo, a absorção de PAMPs gerando a resposta inflamatória, segue uma rota onde, as plaquetas possuem receptores Toll-like 4 na sua membrana, que se associam com o ligante representado por LPS. Então, a ativação das plaquetas se dá através da fosforilação da molécula sinalizadora intracelular, p38 MAP Kinase, fazendo com que a célula libere mediadores vasoativos, 5-hidroxitriptamina e tromboxanos, na corrente sanguínea (Bailey et al., 2009).

De acordo com Faleiros et al. (2011b), dois eventos celulares são importantes e podem conduzir para a ativação de leucócitos, aderência ao endotélio vascular e diapedese do endotélio para o interstício, sendo eles a expressão de moléculas de aderência endotelial e a produção de quimiocinas. A expressão de moléculas de aderência ocorre extremamente rápido, ao passo que as quimiocinas são pequenas citocinas inicialmente envolvidas no recrutamento de células inflamatórias para o sítio primário da injúria e posteriormente para locais remotos.

Uma variedade de células, incluindo células inflamatórias, são capazes de sintetizar e liberar citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ). Esta por sua vez, induz a coagulação intravascular pelo estímulo da atividade pró-coagulante do endotélio vascular, assim como a adesão de leucócitos através da E-selectina e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) (Fontaine et al., 2000), trabalhando como um modulador chave para a indução da imunidade inata, que afeta todos os tipos celulares e contribui significativamente para a defesa do hospedeiro (Leise et al., 2011).

Assim, os neutrófilos, os quais compõem a primeira linha de defesa do organismo, possuem receptores CXCR1 e CXCR2, se ligam às quimiocinas CXCL1, CXCL6 e CXCL8, que também possuem propriedades angiogênicas, devido a ação semelhante em constituintes celulares do tecido vascular, incluindo células endoteliais e músculo liso (Faleiros et al., 2011b). Uma vez aderida ao endotélio vascular, essas quimiocinas, desempenham um papel importante na migração dos neutrófilos para o tecido lamelar equino, na fase de desenvolvimento da laminite, e de células monocíticas, na fase do início da claudicação (Faleiros et al., 2009).

Contudo, ao passo que a migração de leucócitos ocorra para a derme, sua ativação próxima à membrana basal resulta na liberação de matriz de proteases que pode levar a dano e/ou estresse ao epitélio lamelar (Faleiros et al., 2009). Segundo Li et al. (2015), a ativação de metaloproteínas 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) promove a degradação da matriz extracelular, induzindo a destruição do colágeno tipo IV. Tal evento resulta no aumento da permeabilidade da membrana basal e mudanças estruturais deletérias, as quais, incluem o extravasamento de fluido no espaço entre a derme e epiderme (Radziwon-Balicka et al., 2013; Yang et al., 2013).

Segundo Faleiros et al., (2011a), durante a fase de desenvolvimento da laminite ocorre um discreto aumento na expressão da calprotectina no tecido lamelar, que se torna exacerbada nos estágios clínicos iniciais da doença. Esta proteína é o principal constituinte do citoplasma de neutrófilos e pode ser produzida também por monócitos ativados e queratinócitos inflamados (Chiavaccini et al., 2011). Assim, além de configurar-se como importante modulador da resposta inflamatória, pois é um ativador endógeno dos receptores Toll-like que induzem várias quimiocinas promotoras de aderência e extravasamento de leucócitos, a expressão da calprotectina pode significar o aumento da permeabilidade vascular através da ruptura das junções celulares e promoção da necrose concomitante a apoptose (Faleiros et al., 2009).

Como característica da ativação de neutrófilos, a produção excessiva de radicais livres de oxigênio (ROS) estão associados à danos aos tecidos normais durante a migração. O aumento da

concentração de ROS a partir de leucócitos sistêmicos promove aumento da atividade de mieloperoxidase lamelar, matrix de metaloproteinases e elastases (Pouyade et al., 2010; Riggs et al., 2007). Além disso, o óxido nítrico (NO), do radical nitrogênio é produzido por células endoteliais vasculares como mecanismo de controle da vasoconstrição. A combinação de ROS e NO leva a produção de adutos de nitrotirosina e está associado ao comprometimento da função vascular (Hurley et al., 2011).

Juntamente com neutrófilos, o aumento na incidência tecidual de monócitos e macrófagos, marcados pela expressão da proteína CD163, indica que essas células possuem papel importante na falha lamelar (Faleiros et al., 2011a). A expressão desta proteína é bastante restrita a células da linhagem de monócitos e macrófagos. Acredita-se que a expressão dessa proteína esteja mais associada a uma atividade anti-inflamatória (Gorp et al., 2010). Contudo estudos em equinos revelaram que monócitos infiltrados na fase aguda da laminite séptica podem expressar de forma concomitantes marcadores consagrados de ativação pró-inflamatória (Faleiros et al., 2011a).

Entretanto, mudanças morfológicas do tecido lamelar são observadas, tendo como principais características evidenciadas, as relacionadas as interdigitações entre derme e epiderme do casco (Laskoski et al., 2016). O núcleo celular torna-se arredondado, mudando a forma celular e o contorno irregular da membrana basal. Nos casos mais severos de injúria lamelar, ocorre destruição total das interdigitações, com subsequente enfraquecimento do tecido, tornando-o incapaz de exercer sua função (Laskoski et al., 2010; Pollitt, 1996).

### 3.7. MODELOS DE INDUÇÃO DE LAMINITE SÉPTICA

A laminite equina tem sido descrita desde a antiguidade como uma doença quase sempre fatal e terapêuticamente intratável. Durante muito tempo as informações têm sido colhidas de observações e tratamentos de laminite adquirida naturalmente. Isso rendeu um avanço limitado no entendimento dos mecanismos pelos quais a doença se manifesta e como trata-la corretamente (Walsh e Burns, 2017). Buscando uma melhor compreensão da laminite clássica, decorrentes de processos envolvendo a sepse, Harold Garner e colaboradores da Universidade de Missouri, estabeleceram na década de 70 o primeiro modelo experimental de indução de laminite séptica, acompanhada de uma doença alimentar aguda e causada pela ingestão de grande quantidade de carboidratos digestíveis, composto por amido de milho e raspa de madeira (Eades, 2017). Assim, sucessivos trabalhos vêm sendo publicados gerando luz sobre os eventos fisiopatológicos envolvidos com a laminite.

O protocolo desse modelo de sobrecarga de carboidrato preconizava que os animais fossem condicionados a alimentação peletizada, eliminando a forragem por completo por 7 dias. Assim, como alguns autores descrevem, a sopa de amido, composto por 80-85% de amido de milho e 15-20% de raspa de madeira, correspondendo um total de  $17,6\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de peso corpóreo da mistura. Deste modo a sopa apresentava um volume total variando de 12-18L, que geralmente era administrado de 25-30 minutos (Eades, 2017).

Esse modelo mimetiza melhor os eventos refletidos pelos sinais clínicos de um paciente com laminite séptica adquirida naturalmente. Assim, o modelo de laminite por sobrecarga de amido gera um aumento da temperatura corporal, taquicardia, mudanças na coloração da mucosa e inapetência. Esses sinais comumente precedem o início da laminite. Outras alterações importantes são as hematológicas. Embora a contagem total de leucócitos não mude significativamente antes e durante a laminite induzida por sobrecarga de amido (SCA), são observadas importantes alterações nas contagens diferenciais. A contagem de neutrófilos segmentados aumenta em torno de 24 horas após a sobrecarga e permanece aumentada até o início do grau de Obel 3 (Eades, 2017). Os neutrófilos maduros são acompanhados pelo aumento no número de neutrófilos não segmentados. Tanto a contagem de eosinófilos quanto de linfócitos está significativamente diminuída após a SCA. A colite e endotoxemia, ambas associadas ao modelo, são capazes de

causar neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e desvio à esquerda. A contagem de plaquetas no sangue é diminuída transitoriamente, o que pode ser clinicamente importante, pois isso pode indicar a agregação plaquetária (Moore et al., 1981).

As alterações histológicas são caracterizadas por lesões envolvendo edema nas lamelas epidermais secundárias, inchaço e deformação das células epiteliais acúmulo de hemácias em capilares, infiltração de leucócitos perivasculares e migração de leucócitos para a camada epitelial. Estas alterações foram documentadas como eventos vasculares ocorrendo 32 a 72 horas após SCA, isto é, de 4 –24 horas após a claudicação (Eades, 2010).

Outro modelo utilizado como estudo da laminite é o de Extrato de Nogueira Preta (ENP). Este modelo é uma evolução do SCA, que surgiu em 1978, após relatos clínicos da ocorrência de laminite em animais acamados em raspas de madeira de nogueira preta (*Juglans nigra*), com incidência razoavelmente alta, variando de 37-100% dos animais em cada fazenda. A maioria dos animais desenvolvia edema na porção distal dos membros e sinais clássicos de laminite (aumento na temperatura nos cascos e pulsos digitais). Embora apenas sinais leves de laminite tenham sido observados na maioria dos animais, alguns apresentaram sinais mais graves (principalmente grau de Obel 2–3). Tais sinais se tornavam aparentes entre 18 e 26 horas e a maioria dos animais se recuperaram por completo embora dois casos tenham sido realizados eutanásia, em virtude da destruição da interface lamelar com rotação da falange distal (Peroni, 2017).

Tentativas subsequentes infrutíferas foram realizadas buscando reproduzir experimentalmente a laminite, até que Minnick et al. (1987) comprovou a primeira indução experimental bem-sucedida, onde 2g de raspas  $\cdot \text{Kg}^{-1}$  de peso corporal, feitas do cerne de *Juglans nigra* madura colhida no outono e embebidas em 7-8 litros por 12 horas. Assim a solução de coloração vermelho escuro, levemente viscosa, foi filtrado para remover as raspas e administrado via sondagem nasogástrica.

O descobrimento acidental desse novo modelo trouxe consigo justificativas para o modelo alternativo, onde ficou declarado alterações precoces, as quais não eram vistas no SCA, um tempo de evolução mais curto até o Obel 1 e por ser um modelo brando, não acompanhado de fatores complicadores como cólicas, diarreias e choque séptico, como visto no anterior. Embora o uso desse modelo tenha resultado na rápida obtenção de uma grande quantidade de informações valiosas sobre a laminite relacionada à sepse, os animais raramente evoluem para falha lamelar (Peroni, 2017).

Além dos eventos inflamatórios induzidos pela ENP que ocorrem nas lamelas, eventos inflamatórios na circulação, pele, fígado, pulmões e intestino grosso também foram evidenciados. Tem sido relatado que a ETP induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no sangue provavelmente devido à ativação de leucócitos. Como resultado da ativação dos próprios leucócitos e do endotélio vascular ao qual os leucócitos aderem (e migram), a administração de ETP leva ao extravasamento de leucócitos para os tecidos, causando uma diminuição significativa no número de monócitos circulantes junto com a perda de neutrófilos maduros da circulação. Estes leucócitos foram encontrados tanto na pele como em órgãos viscerais mostrando que eventos semelhantes podem ocorrer nesses tecidos como nas lamelas (Peroni, 2017).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

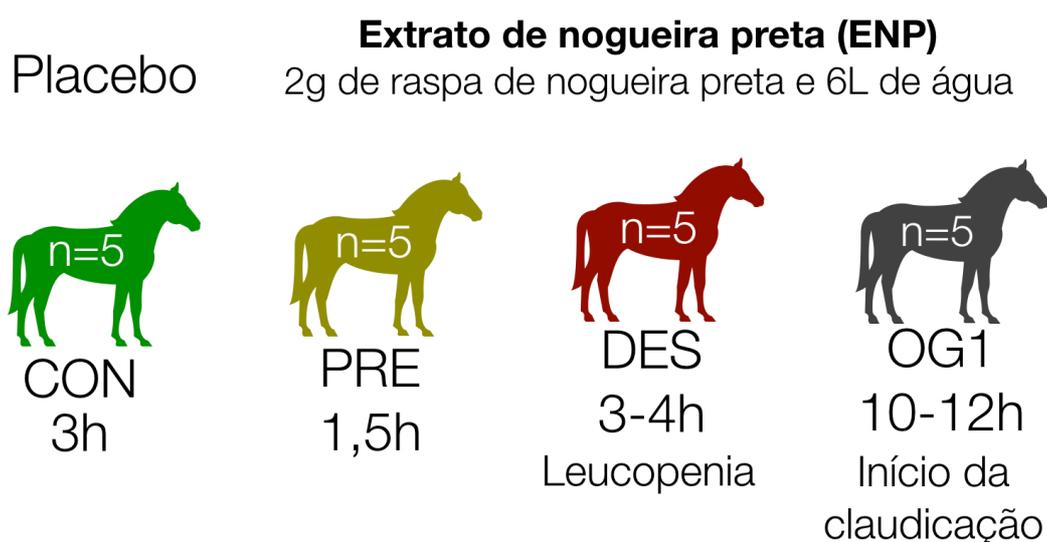
Para o presente estudo utilizaram-se amostras de arquivo (fixadas por formalina e incluídas em parafina) do tecido lamelar de animais usados em experimentos prévios para indução de laminite por meio do modelo de nogueira preta ou de sobrecarga de amido. Todos os protocolos foram aprovados pelos Comitês de Ética de Uso e Pesquisa Animal da Universidade do Estado de Ohio (nogueira preta), da Universidade de Missouri (sobrecarga de amido) e da Universidade Federal de Minas Gerais (sobrecarga de amido).

#### 4.1. MODELO DE LAMINITE POR EXTRATO DE NOGUEIRA PRETA (ENP)

Foram utilizados 20 animais alocados em quatro grupos contendo cinco equinos cada. Sendo um grupo controle (CON), onde as amostras foram obtidas 3h após administração de placebo (água) e três grupos onde as amostras foram obtidas após a administração do extrato de noqueira preta (ENP). Em dois desses grupos, as amostras foram obtidas durante o período de desenvolvimento da laminite, no grupo precoce (PRE) a colheita ocorreu após 1,5h após a administração e no grupo desenvolvimento (DES) a colheita ocorreu no início da leucopenia, 3 a 4h após administração. No terceiro grupo, a colheita ocorreu quando os animais apresentaram início da claudicação, classificada como grau de Obel 1 (grupo OG1), 10-12h após administração.

A metodologia empregada para indução de laminite por noqueira preta seguiu protocolo prévio (Faleiros et al., 2009; Loftus et al., 2007). Resumidamente, foi utilizado 2g de raspa de noqueira preta (*Juglans nigra*)/kg animal, adicionados a 6L de água deionizada. Assim, 6L contendo ENP para os grupos PRE, DES e OG1, enquanto 6L de água foram administrados via sondagem nasogástrica no CON (Figura 3).

Nos tempos previstos, as amostras lamelares foram colhidas sob anestesia geral. Para tanto, os animais foram sedados com cloridrato de xilazina (1,1mg/Kg, IV), a anestesia geral foi induzida 5 minutos após, com uma combinação de diazepam (0,11mg/Kg, IV) e cetamina (2,2mg/Kg, IV), e mantida pela inalação de isoflurano. Os membros torácicos eram então rapidamente desarticulados pela metacarpofalangeana, logo após a colocação de torniquete, e procedia-se a eutanásia com 20 mL/kg (IV) de uma solução contendo pentobarbital sódico (20 mg/Kg) e fenitoína sódica (50 mg/mL). Imediatamente após a desarticulação, amostras de 1,5 cm de espessura do tecido lamelar foram cortadas com uma serra de fita. As lamelas foram dissecadas do casco e da terceira falange, e as amostras foram imersas em formol a 10% com tamponamento neutro por 24 horas, seguida por substituição por etanol a 70%, até a inclusão em parafina.



**Figura 3:** Esquema ilustrando no modelo de ENP como os animais foram alocados e o tempo de coleta das amostras lamelares no CON (3h), grupo PRE (1,5h), grupo DES (3-4h) e OG 1 (10-12h).

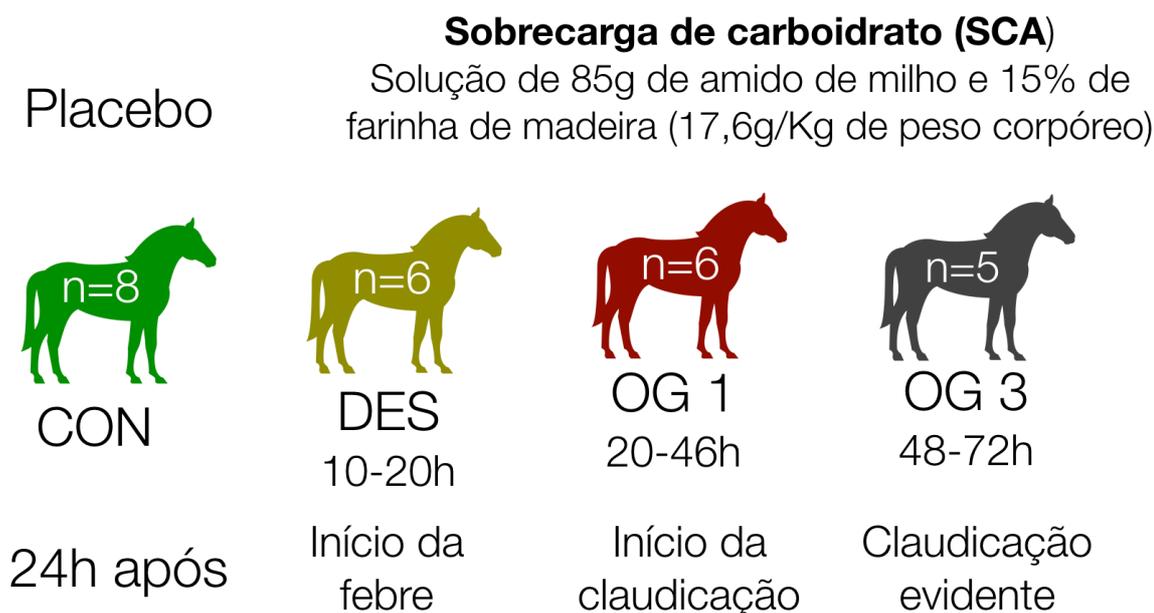
#### 4.2. MODELO DE LAMINITE POR SOBRECARGA DE AMIDO (SCA)

Foram utilizadas amostras de 25 equinos considerados saudáveis, com escore corporal variando de 4-6, e livres de afecção digital e claudicação, após exames físicos e avaliações radiográficas

das falanges distais dos membros torácicos. Os equinos foram alocados em 4 grupos, controle (CON), desenvolvimento (DES), e com claudicação no início (OG1) ou evidente (OG3). No CON (n=8) os equinos receberam apenas água. Nos demais grupos os equinos receberam sobrecarga de amido, sendo as amostras colhidas no início da hipertermia (grupo DES, n=6), no início da claudicação (grupo OG1, n=6), quando a claudicação se tornou bem evidente (OG3, n=5).

A indução da laminite foi realizada pelo tradicional modelo de sobrecarga de carboidrato, conforme previamente descrito (Faleiros et al., 2011c; Paes Leme et al., 2010). Resumidamente, preparou-se uma solução contendo 85% de amido de milho e 15% de farinha de madeira (17,6 g · Kg<sup>-1</sup> de peso corporal), que foi administrada via sondagem nasogástrica nos grupos DES, OG1 e OG3. Para cada equino do grupo CON foi administrado pela mesma via, seis litros de água deionizada, como descrito por Faleiros et al., (2011c).

Todos os equinos foram avaliados em intervalos de 2 horas após a administração de carboidratos ou água. Nos momentos de colheita, As amostras lamelares foram colhidas no grupo DES no início da febre ( $\geq 38,8^{\circ}\text{C}$ , 10-20 horas após), em equinos do OG1 no início da claudicação (20-46 horas após), indicada pela troca constante de apoio nos membros torácicos, e no grupo OG 3 na claudicação evidente (48 a 72 horas após), caracterizada pela relutância em movimentar e resistência à elevação do membro. Os equinos do grupo CON foram anestesiados 24 horas após a administração de água. O protocolo de colheita e conservação das amostras de lamelas seguiram o mesmo protocolo do modelo de indução de laminite por extrato de noqueira preta.



**Figura 4:** Esquema mostrando no modelo de SCA como os animais foram alocados e os tempos de coleta de amostras lamelares. Grupo CON (24h), grupo DES (10-12h), coincidindo com o início da febre, grupo OG 1 (20-46h) representado pelo início da claudicação, e grupo OG 3 (48-72h), quando essa claudicação se torna evidente.

#### 4.3. DETECÇÃO DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA

As amostras em parafina foram seccionadas em 5 $\mu\text{m}$  de espessura e a detecção de DNA fragmentado foi realizada pela técnica de TUNEL, seguindo as recomendações do fabricante do kit comercial (TdT- FragELTM DNA Fragmentation Detection kit, Calbiochem, USA).

Durante o processamento, os cortes foram desparafinizados por imersão em xileno à temperatura ambiente e, posteriormente, hidratados em banhos sucessivos com concentrações decrescentes de

etanol, iniciando com etanol absoluto (100%), seguido de banhos com concentrações de etanol a 90, 80 e 70%, respectivamente, e finalizando com lavagem em 1x TBS. Após essa etapa, foram instilados sobre cada amostra histológica 30µL de triton a 0,5%, incubando-se as lâminas por 10 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, foi utilizada a proteinase K (1:100) diluída em Tris (temperatura ambiente, 10 minutos).

As lâminas foram lavadas em 1x TBS, e a inativação da peroxidase endógena foi obtida incubando-se as lâminas com peróxido de hidrogênio a 3% por cinco minutos. A reação de equilíbrio foi obtida com a aplicação de 100µL por lâmina de solução tampão fornecida pelo fabricante (temperatura ambiente por 10 a 30 minutos). Para a reação de marcação foi feita incubando-se as lâminas com a enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) (37°C, em câmara úmida, por 1,5 hora). A reação foi interrompida por solução tampão, sendo sua detecção feita com o anticorpo conjugado, incubando-se as lâminas em câmara úmida por 30 minutos. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em 1x TBS e utilizou-se a DAB (diaminobenzidina associada ao peróxido de hidrogênio) incubada por cinco minutos em temperatura ambiente para identificação das células marcadas. Em seguida, utilizou-se o verde de metila como contracoloração e as lâminas foram montadas.

#### 4.4. ANÁLISE DAS IMAGENS

Para analisar as lamelas, as quais passaram pelo procedimento de TUNEL, foi utilizado o microscópio de luz. Além disso, todas as imagens inteiras de slide (IIS) foram obtidas de seções com um escaneamento robótico automatizado (T2 Scan Scope) por uma ampliação de 40x, em um período de amostragem espacial de 0,2 µm/pixel. As IIS foram visualizadas através do computador pessoal portátil, utilizando um software (Aperio Image Scope). Assim, para comparar a fragmentação de DNA entre os grupos, foi adotado a contagem de células TUNEL positivas em 12 campos aleatórios, com um aumento de 20x, por animal, sendo quatro na base, 4 no corpo e 4 no ápice das CEBLs, determinados durante a contagem. Em seguida, o número de células apoptóticas foi dividido pela área do campo com aumento de 20x.

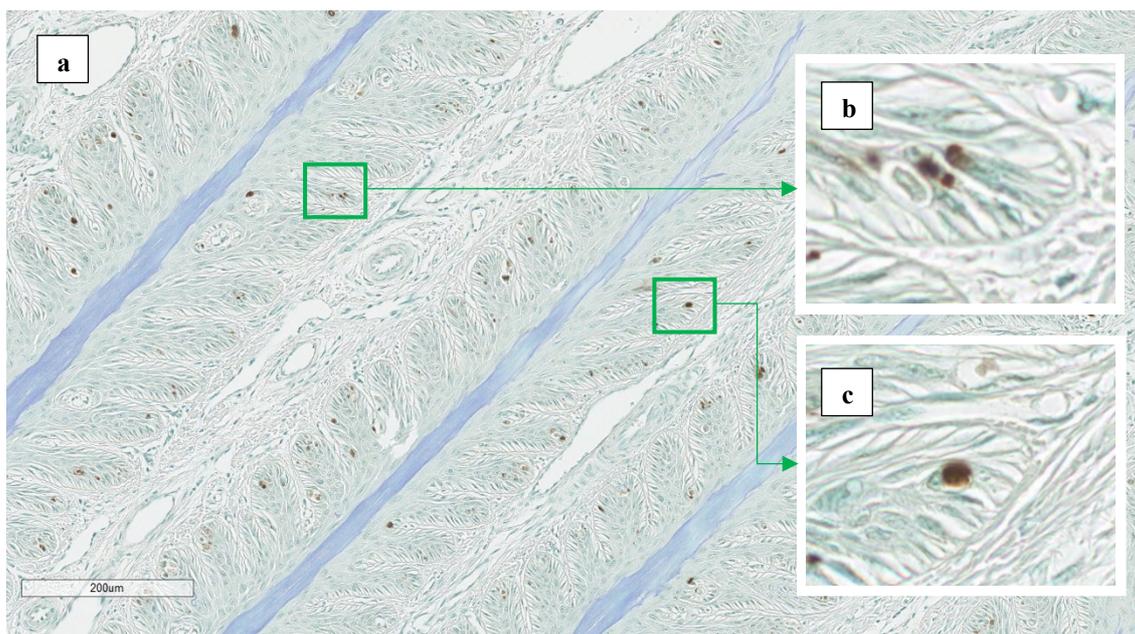
Para efeito de análise de correlação inédita com as contagens de células positivas para TUNEL (apoptóticas), os dados das contagens de leucócitos positivos para calprotectina (neutrófilos e monócitos pró-inflamatórios) e para CD163 (macrófagos e monócitos) foram obtidos de arquivos de estudos prévios, que utilizaram as mesmas amostras (Faleiros et al., 2009; Faleiros et al., 2011a; Faleiros et al., 2011c).

Para avaliar a significância do efeito da indução da laminite em ambos os modelos, sob o número de célula apoptóticas, foi realizado análise de variância, seguido pela comparação das médias pelo teste Student-Newman-Keuls, adotando o valor de  $P < 5\%$ .

Em seguida foi realizado o teste de correlação de Pearson para comparar as contagens de neutrófilos e monócitos com as contagens de apoptose celular nos diferentes tempos dos modelos de indução de laminite propostos.

### 5. RESULTADOS

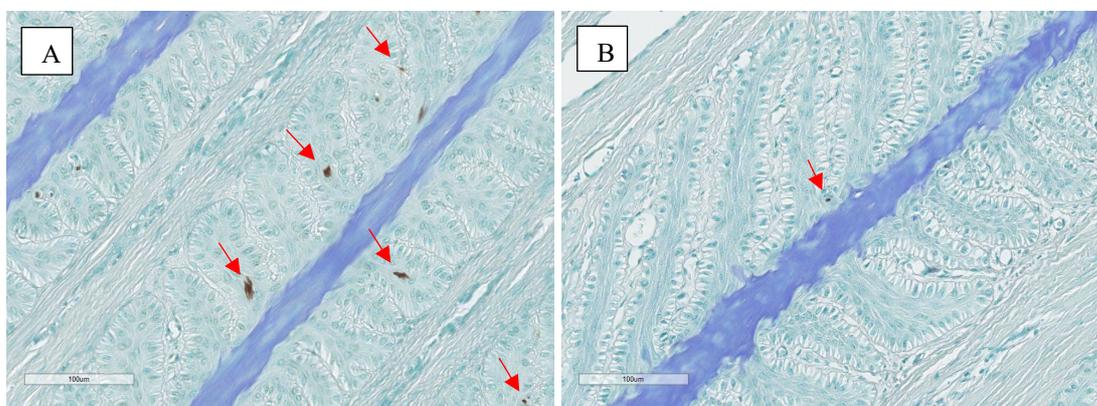
A técnica de coloração de TUNEL teve resultado satisfatório. Isso pode ser constatado pela forte coloração em marrom dos corpos apoptóticos e pela mínima ocorrência de coloração inespecífica no fundo dos cortes histológicos. A grande maioria das células marcadas foram os queratinócitos basais, conforme pode ser visto na Figura 5a. Se observaram marcações tanto do tipo condensadas e centralizadas na célula (Figura 5c), indicando um processo inicial de degradação do DNA dentro do núcleo, como também marcações de pontos menores, difusos pela célula, demonstrando a formação de corpos apoptóticos, já em processo mais avançado de morte celular programada (Figura 5b).

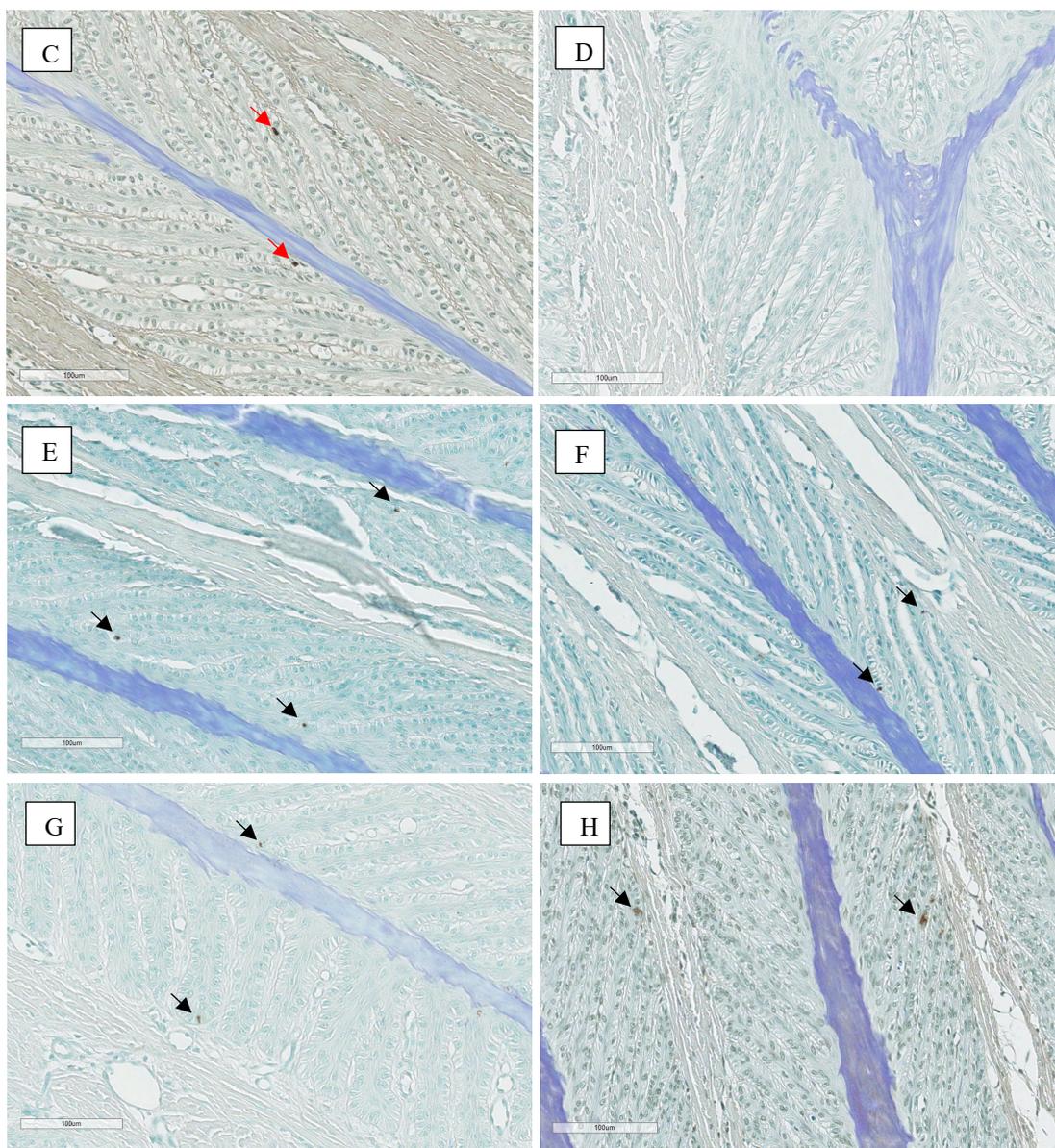


**Figura 5** - Fotomicrografia de tecido lamelar de equinos submetidos a modelo séptico de laminite. Marcação em marrom para TUNEL com contra coloração em verde metila. a) corte histológico do grupo DES do modelo de SCA com aumento de 10x. b) Ampliação de 40x demonstrando pontos difusos, indicando a formação dos corpos apoptóticos. c) Ampliação de 40x mostrando concreção concêntrica intensamente corada pela técnica de TUNEL, indicando início do processo apoptótico intranuclear.

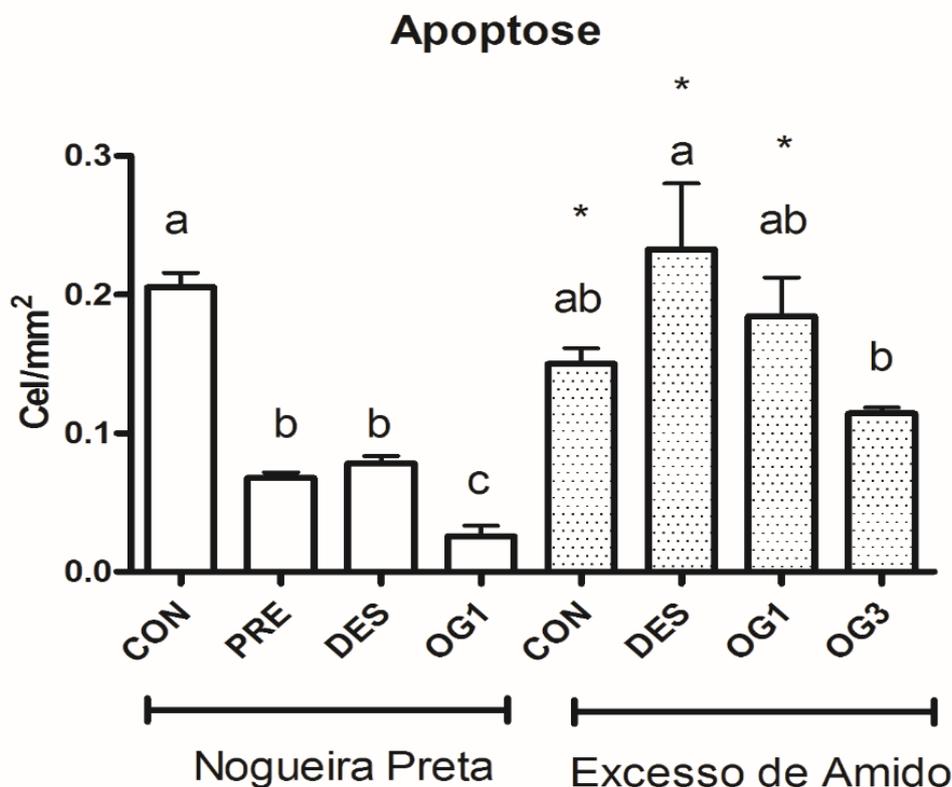
No modelo de ENP os animais CON apresentaram em média ( $\pm$  desvio padrão)  $0,205 \pm 0,023$  células/mm<sup>2</sup>. Nos momentos seguintes, após a administração do extrato, as médias foram  $0,067 \pm 0,008$  no PRE,  $0,078 \pm 0,011$  no DES e  $0,031 \pm 0,011$  células/mm<sup>2</sup> no OG1 (Figura 3). No modelo de sobrecarga de amido, os animais CON apresentaram  $0,149 \pm 0,031$  células/mm<sup>2</sup>. Nos momentos seguintes, após a administração da sobrecarga de amido, as médias foram  $0,232 \pm 0,116$  no DES,  $0,184 \pm 0,068$  no OG1 e  $0,114 \pm 0,009$  células/mm<sup>2</sup> no OG3.

Entre os grupos controles de ambos os modelos ocorreu uma variação de aproximadamente  $0,149$ - $0,205$  células/mm<sup>2</sup>, para os modelos de SCA e ENP, respectivamente. Enquanto ocorre uma queda abrupta de células apoptóticas no grupo DES, representado pelo início da leucopenia, do modelo de ENP, no grupo DES do modelo de SCA ocorreu uma elevação o qual foi sustentado no início da claudicação (OG1), reduzindo apenas quando a apresentação da manqueira se torna evidente ao passo (OG3).





**Figura 6** – Fotomicrografia de material processado pela técnica de TUNEL no modelo de extrato de noqueira preta. Todas as imagens estão com aumento de 20x. Imagem (A) mostrando o grupo CON que apresentam mais células TUNEL positivas. No grupo PRE, representado pela letra (B), há uma redução significativa de células TUNEL positiva. O mesmo ocorre no grupo DES, representado letra (C). na figura (D) demonstra que quase não houve apoptose. Setas vermelhas demonstram a formação de vacúolos de apoptose. Amostras processadas pela técnica de TUNEL no modelo de sobrecarga de amido estão identificadas pelas letras E (grupo CON), F (DES), G (grupo OG1) e H (grupo OG3). Note a marcação das células apoptóticas identificadas pela seta preta.



**Figura 7** - Médias e erros-padrão das contagens de células apoptóticas no tecido lamelar de equinos submetidos aos modelos de noqueira preta e excesso de amido para indução de laminite. Dentro de cada modelo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si. \* difere do mesmo grupo quando comparado ao outro modelo.

Os resultados dos testes de correlação estão representados na Tabela 1. Não se observaram correlações significativas entre as contagens de células apoptóticas e células positivas para CD163 e calprotectina no modelo de excesso de amido. Entretanto, no modelo de ENP, observou-se correlação negativa entre contagens de células apoptóticas e leucócitos positivos para calprotectina.

| Tipo de indução |   | CP/mm <sup>2</sup> |        | CD 163/mm <sup>2</sup> |       |
|-----------------|---|--------------------|--------|------------------------|-------|
|                 |   | Lamela             | Derme  | Lamela                 | Derme |
| ENP             | r | -0,556             | -0,388 | 0,010                  | 0,020 |
|                 | P | 0,013              | 0,100  | 0,970                  | 0,930 |
| SCA             | r | -0,078             | -0,020 | -0,028                 | 0,227 |
|                 | P | 0,720              | 0,931  | 0,903                  | 0,299 |

**Tabela 1** - Índices (r) e seus respectivos valores de significância (P) das correlações entre as contagens de células apoptóticas com as contagens de leucócitos positivos para calprotectina (CP) e CD 163 nos modelos de laminite por extrato de noqueira preta (ENP) e excesso de amido (SCA).

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou identificar a presença de células apoptóticas no tecido lamelar de equinos submetidos a modelos de laminite séptica, e de correlacionar esses achados com as contagens de leucócitos, como passo inicial para se compreender o papel da apoptose em queratinócitos na fisiopatologia da laminite. Para tanto, utilizou-se um método de contagem de células apoptóticas baseado na determinação do número de células positivas para TUNEL em 12

campos aleatórios, distribuídos igualmente nas porções da base, do corpo e do ápice das lamelas. No trabalho de Faleiros et al. (2004), a metodologia empregada foi a contagem de 15 campos por animal estudado, onde o comprimento da lamela primária era calculado e subjetivamente dividido em porções de base, corpo e ápice, para avaliar a localização e distribuição das células apoptóticas. Já trabalhos estudando apoptose no tecido lamelar usaram o método de índice apoptótico, dividindo-se o número de células apoptóticas pelo número de células totais (Gonçalves et al., 2013). A metodologia para contagem realizada neste estudo se apresentou superior às anteriores por determinar o número de células apoptóticas por unidade de área do corte histológico, o que permitiu correlacionar as contagens com a presença de outras células e fazer comparações com outros estudos que usaram a mesma metodologia.

No presente trabalho as contagens de células apoptóticas nos grupos controles ficaram em média entre 0,149 e 0,205 células/mm<sup>2</sup>, sendo consideradas de baixa incidência. O mesmo aconteceu em estudo prévio (Faleiros et al., 2004). Apesar de haver diferença estatística entre as contagens médias dos grupos controles entre os dois modelos, essa não foi considerada relevantes sobre o ponto de vista clínico e devem refletir diferenças de criação, manejo, alimentação ou mesmo de regiões de onde os animais eram oriundos, estados do Ohio (ENP) e Missouri (SCA). Conforme afirmado por Kauffmann e Cline (2017), a estrutura do casco pode se alterar diariamente em resposta ao contínuo fluxo de fatores externos e internos.

Observando-se os resultados das contagens em ambos os modelos, há nítida diferença na dinâmica em relação à evolução clínica do processo de laminite (Figura 4). Enquanto que no modelo SCA, houve, de modo geral, um aumento nas contagens durante o desenvolvimento (DES) e início da claudicação (OG1), no modelo ENP ocorreu o contrário. Ou seja, houve redução significativa das contagens durante os momentos da fase de desenvolvimento (PRE e DES), com queda ainda mais acentuada no início da claudicação (OG1).

Ambos os modelos induzem a laminite através da sepse, a qual está vinculada a uma resposta imunológica gerando a produção e ativação de leucócitos e seus subprodutos. Entretanto, os modelos se diferem pelos tempos dos eventuais acontecimentos e evidências fisiopatológicos.

No caso do modelo SCA, os aumentos de apoptose nos momento de desenvolvimento e início de claudicação podem ser explicados pela evolução do processo séptico e aumento de mediadores inflamatórios que ocorrem nessas fases (Faleiros et al., 2011c; Leise et al., 2011). Em meio à sepse, a apoptose se dá como resposta hiperinflamatória, representando um importante papel na disfunção imunológica que acomete pacientes (Hotchkiss e Nicholson, 2006). Tal evento busca a homeostase com ambiente controlado, embora em processos patológicos como a laminite de origem séptica, um grande número de células apoptóticas no tecido lamelar foram detectadas na interface das lamelas epidérmicas primárias e secundárias, no estágio agudo, sugerindo um notável papel a ser esclarecido (Faleiros et al., 2004). Uma importante questão que pode revelar muito sobre a natureza da apoptose é por que algumas células sofrem apoptose e outras não, durante a sepse. Segundo Hotchkiss e Nicholson (2006), existe uma suspeita de que alguns desses tipos celulares podem sofrer uma rotatividade por apoptose, portanto a sepse provavelmente acelera esses processos fisiológicos.

Já no modelo ENP, no início da claudicação (OG1) a quantidade de radicais livres de oxigênio (RLOs) duplica, o que estaria associado à leucopenia, que ocorre na fase de desenvolvimento, entre 3-4 horas após indução (Hurley et al., 2006). Nesse modelo, o número de leucócitos, representado por células calprotectina positivas, cresce exponencialmente, atingindo o seu maior valor na fase de desenvolvimento no tecido lamelar e no início da claudicação na derme (Faleiros et al., 2009). Acredita-se que a infiltração de leucócitos representa a fonte fisiológica de RLOs e modificações teciduais oxidativas posteriores. Embora também seja produzida por macrófagos quando ativados, provavelmente os neutrófilos sejam responsáveis pelo dano oxidativo aos tecidos na fase aguda devido sua infiltração (Burns et al., 2011; Riggs et al., 2007).

Contudo, no modelo ENP, os RLOs não parecem ter promovido apoptose nos queratinócitos lamelares, pois sua incidência foi inferior no período em que normalmente ocorre a maior infiltração de leucócitos (Faleiros et al., 2009; Riggs et al., 2007). De acordo com (Calcabrini et

al., 2017) o extrato de nozes da noqueira persa (*Juglans regia* L.) apresentou um efeito protetor contra o estresse oxidativo, o qual leva ao dano ao DNA, representando uma das principais causas de apoptose. A noqueira persa é nativa da Europa e Ásia, enquanto a noqueira preta é nativa da parte oriental da América do Norte. Ambas as espécies são monoicas e possuem o mesmo número de cromossomos ( $2n = 32$ ), o que permite o cruzamento destas espécies (Pollegioni et al., 2009). Analisados em conjunto, esses resultados com os do presente trabalho, pode-se pensar que o ENP, apesar de ser eficiente em produzir infiltração leucocitária no tecido lamelar, pode também ter um efeito citoprotetor nos estágios iniciais da laminite, inibindo a indução de apoptose pelos RLOs.

Por outro lado, a *Juglans nigra* (Nogueira Preta) apresenta naftoquinonas relacionadas nas raízes, cascas, folhas e madeira, assim como a *Juglans regia* (Nogueira Persa). E essas substâncias são capazes de suprimir a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), potencializando a apoptose induzida por citocinas e agentes quimioterápicos, em pacientes em tratamento de câncer (Sandur et al., 2006).

Apesar das diferenças na ocorrência de apoptose entre os modelos, não se observaram elevações expressivas nas contagens de células na laminite induzida como as previamente relatadas em equinos com laminite clínica em fase aguda. Também não se observaram, com raras exceções, células com fragmentação de DNA nas adjacências do eixo queratinizado, também relatados nesses casos clínicos (Faleiros et al., 2004). Além disso, houve queda das contagens quando se compara o grupo DES com os grupos OG1 no modelo ENP e OG3 no modelo SCA. Esses achados indicam que a apoptose não é um processo relevante para a lesão tecidual que coincide com o início da claudicação em ambos os modelos. De fato, Faleiros et al., (2004) também não encontram aumentos significativos nas contagens de células apoptóticas na comparação entre grupos CON e nos grupos submetidos aos modelos ENP e SCA.

A laminite de origem séptica é uma doença em que o processo inflamatório insidioso é bastante particular. Como um dos principais mediadores das respostas imunes, os queratinócitos também são alvos de uma inflamação imunologicamente baseada em muitos processos patológicos (Cataisson et al., 2003). No entanto, o processo inflamatório desvincula-se da apoptose celular, quando um fator de transcrição que regula a expressão de genes em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, estresse e infecções bacterianas, como a proteína ativadora 1 (AP-1) é inativado. Segundo Cataisson et al., (2003), esta proteína controla um grande número de processos celulares incluindo diferenciação, proliferação e apoptose, e uma vez inativada, a inflamação prossegue sem a apoptose. Os modelos de laminite utilizados nesse trabalho revelou não haver correlação positiva entre inflamação e apoptose.

O teste de correlação de Pearson mostrou diferença entre os modelos, sendo assim realizado separadamente. Enquanto no modelo SCA não se observou qualquer correlação significativa, no modelo de ENP houve correlação negativa com as contagens de células calprotectina positivas. Enquanto o número de células inflamatórias aumentou, na progressão dos espaços temporais definidos pelos grupos, o número de células apoptóticas diminuiu. Esse resultado confirma os achados encontrados nas contagens, ao mostrar que a inflamação no modelo ENP, evidenciadas pela infiltração de leucócitos, parece induzir apoptose nas células do tecido lamelar.

Segundo Faleiros et al. (2004), a confirmação da técnica de TUNEL se dá por meio do ensaio para caspase 3 positiva para apoptose. Ainda de acordo com esse autor, o fato do crescimento contínuo do casco ocorrer na interface de células epidérmicas e membrana basal, poderia explicar a ocorrência de apoptose dessas células em função da constante remodelação tecidual nessa região. Uma das limitações do presente trabalho foi a ausência da avaliação imunoistoquímica da caspase 3.

## 7. CONCLUSÃO

Ambos os modelos não produziram aumentos significativos na ocorrência de apoptose no tecido lamelar tanto na fase de desenvolvimento quanto no início da claudicação.

Os modelos de laminite por extrato de noqueira preta (ENP) e sobrecarga de amido (SCA) produzem efeitos diferentes sobre a ocorrência de apoptose nos queratinócitos do tecido lamelar, havendo redução durante o desenvolvimento e início de claudicação no modelo ENP.

No modelo ENP houve a única correlação significativa entre apoptose e infiltração leucocitária, demonstrando que ocorre concomitante aumento de infiltrado leucocitário com redução na ocorrência de apoptose no tecido lamelar.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose : uma visão bioquímica e molecular Apoptosis Cell Death : biochemistry and molecular aspects. *Metrocamp Pesquisa*, v. 1, n. 1, p. 37–58, 2007.

BAILEY, S. R.; ADAIR, H. S.; REINEMEYER, C. R. *et al.* Plasma concentrations of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose-induced laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 129, p. 167–173, 2009.

BELKNAP, J. K.; BLACK, S. J. Sepsis-related laminitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 44, p. 738–740, 2012.

BELKNAP, J. K.; GIGUÈRE, S.; PETTIGREW, A. *et al.* Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness : innate vs . adaptive immune response. *Equine Veterinary Journal*, v. 39, p. 42–47, 2007.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *American College of Chest Physicians*, p. 1644–1655, 1992.

BOWKER, R. M.; WULFEN, K. K. VAN; SPRINGER, S. E. *et al.* E. Functional anatomy of the cartilage of the distal phalanx and digital cushion in the equine foot and a hemodynamic flow hypothesis of energy dissipation. *Journal of Veterinary Research*, v. 59, n. 8, p. 961–968, 1998.

BROOKS, G. A.; DUBOUCHAUD, H.; BROWN, M. *et al.* Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Anais. 1999. v. 96, n. 3, p. 1129-1134.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews microbiology*, v. 5, p.577-582, 2007

BURNS, T. A.; WESTERMAN, T.; NUOVO, G. J. *et al.* Role of Oxidative Tissue Injury in the Pathophysiology of Experimentally Induced Equine Laminitis : A Comparison of 2 Models. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 25, p. 540–548, 2011.

CALCABRINI, C.; BELLIS, R. DE; MANCINI, U. *et al.* Protective Effect of *Juglans regia* L . Walnut Extract Against Oxidative DNA Damage. *Plant Foods Hum Nutr*, v. 72, p. 192–197, 2017.

CATAISSON, C. *et al.* Activation of Cutaneous Protein Kinase C  $\alpha$  Induces Keratinocyte Apoptosis and Intraepidermal Inflammation by Independent Signaling Pathways. *The Journal of Immunology*, v. 171, p. 2703–2713, 2003.

CHIAVACCINI, L.; HASSEL, D. M.; SHOEMAKER, M. L. *et al.* Detection of calprotectin and apoptotic activity within the equine colon from horses with black walnut extract-induced laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 144, n. 3–4, p. 366–373, 2011.

EADES, S. C. Overview of Current Laminitis Research. *Vet Clin Equine*, v. 26, p. 51–63, 2010.

EADES, S. C. Experimental Models of Laminitis: Starch Overload. In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). **Equine Laminitis**. 1. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2017. p. 54-58.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, p. 495-516, 2007.

FALEIROS, R. R.; JOHNSON, P. J.; NUOVO, G. J. *et al.* Laminar Leukocyte Accumulation in Horses with Carbohydrate Overload-Induced Laminitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 25, p. 107–115, 2011c.

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

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

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

FALEIROS, R. R.; STOKES, A. M.; EADES, S. C. *et al.* Assessment of apoptosis in epidermal lamellar cells in clinically normal horses and those with laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 65, n. 5, 2004.

FONTAINE, G. L.; BELKNAP, J. K.; ALLEN, D. *et al.* Expression of interleukin-1  $\beta$  in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n. 5, p. 714–720, 2000.

FOGARTY, C. E.; BERGMANN, A. Killers creating new life: caspases drive apoptosis- induced proliferation in tissue repair and disease. *Cell Death and Differentiation*, v. 24, p. 1390–1400, 2017.

FRENCH, K. R.; POLLITT, C. C. Equine laminitis : glucose deprivation and MMP activation induce dermo-epidermal separation in vitro. *Equine Veterinary Journal*, v. 36, p. 261–266, 2004.

GONÇALVES, C. A. P. .; BOTTEON, P. T. L. .; ALVES, G. E. S. . *et al.* lamelares de equinos com laminite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 5, p. 1409–1418, 2013.

GORP, H. VAN; DELPUTTE, P. L.; NAUWYNCK, H. J. Scavenger receptor CD163 , a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Molecular Immunology*, v. 47, n. 7–8, p. 1650–1660, 2010.

HARRIS, P. Laminitis after 2000 years : Adding bricks to our wall of knowledge. *The Veterinary Journal*, v. 191, n. 3, p. 273–274, 2012.

HOTCHKISS, R. S.; NICHOLSON, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature*, v. 6, p. 813–822, 2006.

HURLEY, D. J.; HURLEY, K. A. E.; GALLAND, K. L. *et al.* Evaluation of the ability of aqueous black walnut extracts to induce the production of reactive oxygen species. *American Journal of Veterinary Research*, v. 72, n. 3, p. 308–317, 2011.

HURLEY, D. J.; PARKS, R. J.; REBER, A. J. *et al.* Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 110, p. 195–206, 2006.

HYNES, R. O. Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines. *Cell*, v. 110, p. 673–687,

2002.

KAUFFMANN, S.; CLINE, C. **The Essential Hoof Book: the complete modern guide to horse feet - anatomy, care and health, disease diagnosis and treatment.** 1. ed. North Pomfret: Trafalgar Square Books, 2017. p. 12-14.

KEIZER, P. L. J. DE. The Fountain of Youth by Targeting Senescent Cells ? *Trends in Molecular Medicine*, v. 23, n. 1, p. 6–17, 2017.

KERR, J. F. R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, v.181, n.182, p. 471-474, 2002.

KERR, J. F. R. Neglected Opportunities in Apoptosis Research. *Trends in Cell Biology*, v. 5, p. 55-57, 1995.

LANE, H. E.; BURNS, T. A.; HEGEDUS, O. C. *et al.* Lamellar events related to insulin-like growth factor-1 receptor signaling in two models relevant to endocrinopathic laminitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 49, n. 5, p. 643–654, 2017.

LASKOSKI, L. M. .; VALADÃO, C. A. A. .; VASCONCELOS, R. O. *et al.* Morphological abnormalities and apoptosis in lamellar tissue of equines after intestinal obstruction and treatment with hydrocortisone. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 6, p. 1331–1339, 2010.

LASKOSKI, L. M.; DITTRICH, R. L.; DECONTO, I. *et al.* An update on equine laminitis. *Ciência Rural*, v. 46, n. 3, p. 547–553, 2016.

LEACH, D. H. **The Structure And Function Of The Equine Hoof Wall.** 1980. 261 p. (Tese de Doutorado). Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan.

LEISE, B. The role of neutrophils in equine laminitis. *Cell and Tissue Research*, v. 371, p. 541–550, 2018.

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

LEME, F. O. P.; MARVAL, C. A. DE; SANTOS, R. L. *et al.* Histopatologia das lâminas do casco de equinos com laminite aguda induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 2, p. 241–250, 2010.

LI, X.; JIANG, R.; WANG, G.; *et al.* MMP-2 plays an important role during the early acute developmental phase of oligofructose-induced equine laminitis. *Bull Vet Inst Pulawy*, v. 59, n. 1, p. 149–153, 2015.

LOFTUS, J. P.; BLACK, S. J.; PETTIGREW, A. *et al.* Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut – induced laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 68, n. 11, p. 1205–1211, 2007.

MARIK, P. E.; TAEB, A. M. SIRS , qSOFA and new sepsis definition. *Journal of Thoracic Disease*, v. 9, n. 4, p. 943–945, 2017.

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

MITCHELL, K.; SCHOSTER, A. Shock: Pathophysiology, Diagnosis, Treatment, and Physiologic Response to Trauma. In: AUER, J. A.; STICK, J. A., *et al* (Eds.). **Equine Surgery.** 5. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018. p. 1-14.

- MOORE, J. N.; GARNER, H. E.; COFFMAN, J. R. Haematological changes during development of acute laminitis hypertension. *Equine veterinary journal*, v. 13, n. 4, p. 240-242, 1981.
- MOORE, J. N.; VANDENPLAS, M. L. Is it the Systemic Inflammatory Response Syndrome or Endotoxemia in Horses with Colic ? *Veterinary Clinics Equine*, 2014.
- NOSCHKA, E.; VANDENPLAS, M. L.; HURLEY, D. J. *et al.* Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 129, p. 242–253, 2009.
- OLSON, R. L. ; EVERETT, M. A. Epidermal Apoptosis : Cell Deletion by Phagocytosis. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 2, p. 53–57, 1975.
- PARKS, A. Anatomy and Function of Equine Digit. *In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). . Equine Laminitis*. 1. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2017. p. 13–21.
- PERONI, J. F. Experimental Models of Laminitis: Black Walnut Extract. *In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). Equine Laminitis*. 1. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2017. p. 64-67.
- POLLEGIONI, P.; WOESTE, K.; MAJOR, A. *et al.* Characterization of *Juglans nigra* ( L .), *Juglans regia* ( L .) and *Juglans x intermedia* (Carr.) by SSR markers: a case study in Italy. *Silvae Genetica*, v. 58, p. 68–78, 2009.
- POLLITT, C. C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 28, n. 1, p. 38–46, 1996.
- POLLITT, C. C. Equine Laminitis : A Revised Pathophysiology. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**. Anais.1999. v. 45, p. 188-192.
- POLLITT, C. C. The Anatomy and Physiology of the Suspensory Apparatus of the Distal Phalanx. *Veterinary Clinics of Equine*, v. 26, n. 1, p. 29–49, 2010.
- POLLITT, C.C. Lamellar Function at the Cellular level. *In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). . Equine Laminitis*. 1. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2017. p. 22–38.
- POLLITT, C. C.; COLLINS, S. N. The suspensory apparatus of the distal phalanx in normal horses. *Equine Veterinary Journal*, v. 48, p. 496–501, 2016.
- POLLITT, C. C.; VISSER, M. B. Carbohydrate Alimentary Overload Laminitis. *Veterinary Clinics Equine*, v. 26, n. 1, p. 65–78, 2010.
- POUYADE, G.; RIGGS, L. M.; MOORE, J. N. *et al.* Equine neutrophil elastase in plasma , laminar tissue , and skin of horses administered black walnut heartwood extract. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 135, p. 181–187, 2010.
- RADZIWON-BALICKA, A.; RAMER, C.; LA ROSA, C. M. DE. *et al.* Angiostatin inhibits endothelial MMP-2 and MMP-14 expression : A hypoxia speci fi c mechanism of action. *Vascular Pharmacology*, v. 58, n. 4, p. 280–291, 2013.
- RIGGS, L. M.; FRANCK, T.; MOORE, J. N.; KRUNKOSKY, T. M. *et al.* Neutrophil myeloperoxidase measurements in plasma , laminar tissue , and skin of horses given black walnut extract. *American Journal of Veterinary Research*, v. 68, n. 1, p. 81–86, 2007.
- SANDUR, S. K.; ICHIKAWA, H.; SETHI, G. *et al.* Plumbagin (5-Hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) Suppresses NF-kB Activation and NF-kB-regulated Gene Products Through Modulation of p65 and IκBα Kinase Activation, Leading to Potentiation of Apoptosis Induced by Cytokine and Chemotherapeutic Agents. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 25, p. 17023–17033, 2006.
- SCHURR, A.; PAYNE, R. S.; MILLER, J. J. *et al.* Preischemic Hyperglycemia-Aggravated Damage : Evidence That Lactate Utilization Is Beneficial and Glucose-Induced Corticosterone

- Release Is Detrimental. *Journal of Neuroscience Research*, v. 789, n. 66, p. 782–789, 2001.
- SCHWARZ, A.; BHARDWAJ, R.; ARAGANE, Y. *et al.* Ultraviolet-B-Induced Apoptosis of Keratinocytes: Evidence for Partial Involvement of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in the Formation of Sunburn Cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 104, n. 6, p. 922–927, 1995.
- SEYMOUR, C. W. *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Journal of the American Medical Association*, v. 315, n. 8, p. 762–774, 2016.
- SINGER, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Clinical Review & Education*, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.
- TAYLOR, S. A review of equine sepsis. *Equine Veterinary Education*, v. 27, n. 2, p. 99–109, 2015.
- WALSH, D. M.; BURNS, T. A. Historical Perspective on Equine Laminitis. In: BELKNAP, J. K.; GEOR, R. (Eds.). **Equine Laminitis**. 1. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2017. p.3-10
- WATTLE, O.; POLLITT, C. C. Lamellar Metabolism. *Clinical Techniques in Equine Practice*, p. 22–33, 2004.
- WERNERS, A. H.; BRYANT, C. E. Pattern recognition receptors in equine endotoxaemia and sepsis. *Equine Veterinary Journal*, v. 44, p. 490–498, 2012.
- YANG, J.; WANG, G.; GAO, C. *et al.* Effects of hyperbaric oxygen on MMP-2 and MMP-9 expression and spinal cord edema after spinal cord injury. *Life Sciences*, v. 93, n. 25–26, p. 1033–1038, 2013.
- ZAISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*. v.40, p. 481-495, 2003.