

**APARECIDA JOANA MORETO**

**Expressão de proteínas de proliferação e de apoptose nos eventos fisiológicos e patológico do epitélio aglandular da mucosa gástrica de equinos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan /ICB, para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

Versão Parcial.

São Paulo  
2019

## RESUMO

Moreto, A.J. **Expressão de proteínas de proliferação e de apoptose nos eventos fisiológicos e patológico do epitélio aglandular da mucosa gástrica de equinos.** 2019. 48f. Mestrado em Biotecnologia – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A úlcera gástrica é uma doença prevalente entre os equinos e está relacionada ao desequilíbrio entre os fatores protetores e lesivos intrínsecos que alteram os mecanismos de defesa da mucosa gástrica, resultando em lesões que podem evoluir para úlceras na região aglandular (80%) ou glandular (20%). Etiologicamente, o estresse, a rotina nutricional, agente infeccioso, tratamento prolongado com anti-inflamatórios não esteroidais e atividade física intensa são os principais fatores apontados como causadores de úlcera em equino. A manutenção da integridade do epitélio ocorre por um complexo processo mediado principalmente pelos fatores de crescimento, de transcrição e citocinas que estimulam a re-epitelização, angiogênese, proliferação e migração das células precursoras (células-tronco) que se dirigem para margem da úlcera no tecido de granulação e cobrem o leito da lesão. Sob o prisma da apoptose, a via mitocondrial é a mais frequente e pode ser induzida ou inibida por estímulos intracelulares, controlados pela família de proteína Bcl-2, que por sua vez ativa caspases efetoras que iniciam e propagam a cascata apoptótica. O reconhecimento das taxas de proliferação e de apoptose (via intracelular) entre os distintos tipos celulares torna-se primordial para o entendimento morfofuncional da manutenção da integridade do epitélio aglandular da mucosa gástrica de equinos. Assim, almeja-se avaliar o mecanismo de desenvolvimento de úlceras gástricas na mucosa aglandular de estômago de equinos, próximo à margem pregueada por meio da análise das taxas de morte (por apoptose) e proliferação celular no epitélio dessa região. Então, foi feito (por meio de imuno-histoquímica) a análise da taxa de proliferação (utilizando anticorpo anti-PCNA), taxa de inibição de apoptose (utilizando anticorpo anti-BCL-2) e taxa de apoptose (utilizando anticorpo anti-caspase-3) de amostras provenientes da região aglandular do estômago de 5 cavalos. As taxas médias de proliferação pela PCNA para as amostras híginas e ulceradas foram, respectivamente, 55,52% e 62,72% ( $p = 0,001$ ) indicando um aumento de 7,2% nas amostras ulceradas. A taxa média de inibição de morte celular (células Bcl-2 positiva) para as amostras híginas e ulceradas foram, respectivamente, 53,92% e 58,75% ( $p = 0,001$ ) indicando um aumento de 4,8% nas amostras ulceradas. A taxa média de apoptose pela Caspase-3 para as amostras híginas e ulceradas foram, respectivamente, 72,54% e 68,02% ( $p = 0,001$ ) indicando um aumento de 4,52% nas amostras híginas. Estes dados sugerem que a principal causa de morte celular durante a formação da úlcera não é devido ao aumento da

apoptose e que a apoptose pode ser um mecanismo de defesa do tecido. Portanto, ocorreu aumento na proliferação celular nas amostras com lesões erosivas na mucosa aglandular do estômago de equinos para a correção da lesão devido ao aumento da morte. As causas da formação das lesões ulcerativas não estão relacionadas com apoptose. Além disso, o aumento da inibição da apoptose ocorreu como meio de diminuir a perda celular por apoptose na área lesionada.

**Palavras-chave:** Proliferação. Morte celular. Margem pregueada. Cavalos. Úlcera gástrica

## ABSTRACT

Moreto, A.J. **Proliferation of protein expression and apoptosis in the event of physiological and pathological non-glandular epithelium of gastric mucosa of horses.** 2019. 48f. Master thesis Biotechnology – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The gastric ulcer is a horse prevalent disease that is related to the imbalance between the intrinsic protective and harmful factors that alter the defense mechanisms of the gastric mucosa, resulting in injuries that can develop into ulcers in the non-glandular region (80%) or glandular (20%). Etiologically, the stress, nutritional habit, bacterial infection, high intensity of physical activity and using of anti-inflammatory non-steroidal are pointed to cause gastric ulcer in horses. Maintaining the integrity of the gastric epithelium occur by complex process mediated by growth factor, transcription factor and cytokine that stimulate re-epithelialization, angiogenesis, proliferation, and migration of precursor cells (stem cells) that go to the margin of the ulcer in the granulation tissue and cover the lesion bed. From the perspective of apoptosis, mitochondrial pathway is the most frequent, and can be induced or inhibited by intracellular stimuli, controlled by Bcl-2 protein family, which in turn activates effector caspases that initiate and propagate the apoptotic cascade. The recognition of proliferation and apoptotic rates (intracellularly) between the different cell types becomes paramount to understanding the morpho-functional non-glandular maintaining the integrity of the gastric mucosal epithelium of horses. Thus, the present study aims to evaluate the mechanism of development of gastric ulcers in equine non-glandular squamous mucosa, near to the *margo plicatus* by analyzing death rates (by apoptosis) and cell proliferation in the epithelium of this region. Then, it was investigated proliferation rate (using anti-PCNA antibody), apoptosis inhibition rate (using anti-BCL-2 antibody) and apoptosis rate (using anti-caspase antibody). This study was performed to samples of non-glandular squamous mucosa from 5 equines non-glandular. The mean of proliferation rate (PCNA) for healthy and ulcerated samples were, respectively, 55.52% and 62.72% ( $p = 0.001$ ), an increase of 7.2% in the ulcerated samples; The mean inhibition of cell death rate (positive Bcl-2 cells) for healthy and ulcerated samples were, respectively, 53.92% and 58.75% ( $p = 0.001$ ) showing an increment of 4.8% in healthy ulcerated samples; The mean of apoptosis rate (Caspase-3) for healthy and ulcerated samples were, respectively, 72.54% and 68.02% ( $p = 0.001$ ), an increment of 4.52% in the healthy samples. It suggests that the principal reason of cells death during ulcer development in horse is not due to apoptosis and the apoptosis death can be a defense mechanism to gastric non-glandular. Therefore, Therefore, there was an increase in cellular proliferation in erosive lesioned samples from non-glandular mucosa of the

equine stomach to correct the injury due to increased death. The cellular death rate was increased in equine gastric disease due to non-apoptotic death increment, and this result in development of ulcer lesion; The cell death inhibition was increased in ulcer samples as a way to decrease the number of cells lost by apoptosis in lesion areas.

**Keys-word:** Proliferation. Cell death. *Margus plicatus*. Horse. Gastric ulcer.

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos séculos os cavalos tiveram um papel muito importante no processo de desenvolvimento da civilização humana sendo empregados em diferentes atividades, tais como produção de alimentos (carne e leite), para fins militares, em processos agrícolas e para recreação e esporte (KHADKA, 2010; PARKER, 2008).

Apesar de não se saber com certeza quando ocorreu a domesticação dos equinos, evidências sugerem que foi durante a idade do Cobre por volta de 4.000 e 2.500 a.C. (KHADKA, 2010; PARKER, 2008; CINTRA, 2011). Esse processo teve grande impacto na qualidade de vida dos animais, e muitas vezes a falta de conhecimento dos proprietários e tratadores sobre manejo adequado, ignorando o processo evolutivo e adaptativo da alimentação dos cavalos (adaptado a pastagem) pode resultar no desenvolvimento de doenças, como cólica e úlceras gástrica. (ARANZALES; ALVES, 2013; PILLINER; DAVIES, 2004).

Os equinos são herbívoros, não ruminantes, fermentadores pós-gástricos, que por possuírem estômago relativamente pequenos (aproximadamente 10% do volume do canal gastrointestinal) passam de 13 a 18 horas diárias alimentando-se (PILLINER; DAVIES, 2004; CINTRA, 2011). Possuem uma dieta baseada principalmente de alimentos ricos em celulose e outros carboidratos complexos (alimentos que apresentam baixos valores nutritivos) (HINTZ, 1994; ROBRISON; SLADE 1974).

No entanto, diferentes afecções em estruturas e órgãos do sistema digestório podem interferir na efetividade dos processos gastrointestinais, bem como ocorre com estômago dos equinos, que devido a suas características singulares expõem o animal ao desenvolvimento de doenças como a úlcera gástrica que eventualmente resulta em morte ou deterioração da qualidade de vida do animal (ARANZALES; ALVES, 2013; BUCHANAN; ANDREWS, 2003; MORAES et al., 2008).

A úlcera gástrica é uma gastropatia comum em cavalos e potros e por ser uma doença multifatorial, muitos autores a designa como Síndrome da Úlcera Gástrica Equina (BELL; MOGG; KINGSTON, 2007). Ela ocorre quando a barreira de glicoproteínas da mucosa é comprometida afetando a integridade das células da mucosa podendo atingir a camada superficial envolvendo apenas mucosa, mais profunda envolvendo a mucosa e estendendo-se a submucosa, e profunda envolvendo a mucosa, submucosa, estendendo-se para a túnica muscular (ANDREWS et al., 1999; ANDREWS et al., 2005).

A prevalência do desenvolvimento de lesões gástricas equina (incluindo hiperqueratose, erosão e úlcera) pode apresentar taxas de 35% a 100% dependendo da raça do

animal, da carga de trabalho diária, o tipo de alimentação e a forma de criação (LUTHERSSON, 2009; MURRAY, 1994). As prevalências podem variar de 25% a 50% em potros, 60% a 90% em equinos adultos e acima de 90% em cavalos de corrida (ou que apresentam elevada rotina de atividade física (ANDREWS; NADEAU, 1999; LUTHERSSON, 2009).

Normalmente os animais submetidos à regime de treinamento e a eventos de competição são os mais afetados pela doença, podendo chegar a 100% no número de casos, tal como Murray e colegas observaram. (MURRAY et al., 1996).

Eles notaram que 63 dos 67 cavalos (94%) submetidos ao treinamento tinham uma ou mais lesões na mucosa gástrica e que todos os 42 cavalos do mesmo grupo que competiram dois meses antes dos exames, possuíam lesão na mucosa (MURRAY et al., 1996). Eles observaram também, que a taxa chegou a 100% no grupo de animais que foram mantidos em treinamento por mais tempo (MURRAY et al., 1996). Assim, estes autores confirmaram a existência de uma forte relação entre atividade física intensa e a duração de treino com a formação de lesões gástricas ulcerativa nos equinos.

Contudo, Ward, et al 2015 mostraram em seus estudos que mesmos animais selvagens adultos (animais não domesticados e nem submetidos a treinamento intenso) também desenvolvem lesões no estômago (22,2% no epitélio glandular, 29,6% no epitélio aglandular e 7,4% em ambas as regiões gástricas), sugerindo que as causas que levam ao desenvolvimento das úlceras no estômago dos cavalos é um processo muito mais complexo do que apenas rotina de atividade física e a domesticação (WARD et al., 2015).

Outro fator bastante importante causador de lesões gástrica em equino é o período prolongado de jejum, que aparentemente resulta na diminuição do pH do estômago dos animais levando a formações de lesões. Murray e Schusser (1993) observaram (por meio de estudo utilizando um eletrodo de pH inserido e fixado no estômago de 5 cavalos submetidos à um intervalo de apenas 24h de jejum) que quando os animais foram proibidos de se alimentar, esses apresentaram maior porcentagem de registro de pH inferior a 2 (76%) enquanto que quando tiveram livre acesso ao alimento a porcentagem de registro de pH inferior a 2 foi menor (36%) (MURRAY; SCHUSSER, 1993). Portanto, é possível constatar que o jejum prolongado está relacionado com a diminuição do pH gástrico que favorece o desenvolvimento de lesões (MURRAY, 1994; MURRAY; EICHORN; JEFFREY, 2001).

Além disso, Murray e colegas (2001) realizaram, posteriormente outro estudo que confirmam os efeitos que o jejum prolongado (superior a 24h) pode causar na mucosa gástrica, eles observaram que animais normais desenvolveram insulto progressivo (erosão e úlcera) devido aos períodos mais prolongados de jejum de 36-72h (24h de jejum seguida por 12h de

acesso ao alimento) (MURRAY; EICHORN; JEFFREY, 2001). Dessa forma eles mostram que a impossibilidade dos animais se alimentarem nos intervalos adequados pode resultar na formação de lesões na mucosa do estômago devido à diminuição do pH na região e ainda permite o contato do ácido com mucosa por maior período. Estudos explicam que as principais razões para diminuição pH no estômago dos animais em jejum são o padrão de secreção de ácido clorídrico pelo estômago dos equinos (que é constante), concomitantemente com a ausência de secreção de saliva (substância que em cavalos é secretada pelo estímulo da mastigação, não apresenta atividade enzimática, mas possui característica básica por ser composta por bicarbonato, um tampão) (LUTHERSSON et al., 2009).

Etiologicamente, o estresse, a rotina nutricional (tipo de alimento e tempo de jejum), agente infeccioso, tratamento prolongado com anti-inflamatórios não esteroidais e atividade física intensa são os principais fatores apontado como causadores de úlcera em equino (ANDREWS et al., 1999; NADEAU et al., 2000; MURRAY, 1994; MURRAY; EICHORN, 1996; ROY, 2005).

Estudos mostram que a atividade física pode aumentar os casos e a gravidade da úlcera nos animais (HARTMANN; FRANKENY, 2003; MURRAY, 1994). Hartmann (2003) ao analisar um grupo de cavalos antes do treinamento obteve uma taxa de 17,4% de caso, no entanto após três dias consecutivos de treino, foi observada uma evolução de 56,5% no número de animais com ulcera gástrica na região adjacente à margem pregueada, além de um agravamento de 75% no grau classificatório da doença, constatando que dificilmente as ulcerações cicatrizam e se curam espontaneamente se o animal for mantido em regime de treinamento e que as mesmas tendem a se agravar (HARTMANN; FRANKENY, 2003).

Embora os animais afetados por essa doença possam apresentar alterações clínicas Niedźwiedź e colegas (2013) observaram ao analisar 108 cavalos de diferentes raças e idades que os animais podem desenvolver ulcerações gástrica, mas não apresentarem sintomas (NIEDŹWIEDŹ; KUBIAK; NICPOŃ, 2013). Contudo, a doença é caracterizada por causar perda de apetite e de peso, mudança comportamental, desconforto abdominal e decréscimo no desempenho físico ou relutância para treinar (MURRAY; CAROLYN, 1989; THOMASSIAN, 2005).

Outra questão importante em relação ao desenvolvimento das úlceras em cavalos é a topografia anatômica de sua incidência no estômago dos animais (ANDREWS; NADEAU, 1999; FRANDSON; WILKE; FAILS, 2011). Isto se deve ao fato de que o estômago do equino tem duas regiões morfológicamente e fisiologicamente bem determinadas separadas pela margem pregueada (*margo plicatus*): uma região, localizada na extremidade esofágica,

constituída por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (região aglandular); e outra localizada na parte pilórica constituída por tecido glandular (ANDREWS; NADEAU, 1999; FRANDSON; WILKE; FAILS, 2011).

De acordo com a literatura, cerca de 80% das lesões que são formadas na mucosa gástrica equina encontram-se na região proximal mais especificamente na região aglandular, adjacente à margem pregueada e 20% na região distal (glandular) (LUTHERSSON et al., 2009; MARTINEAU; THOMPSON; TAYLOR, 2009; VIDELA; ANDREWS, 2009). Todavia, esses valores podem variar dependendo das características do animal e o tipo de manejo que são submetidos, por exemplo: Murray (1994), observou que 100% das lesões gástricas ulcerativas desenvolvidas em animais submetidos a privação de alimento ocorreram na região aglandular e nenhuma na região glandular (MURRAY, 1994). E Luthersson e colegas (2009) apesar de encontrarem proporções diferentes entre as duas regiões (aglandular 31%, glandular 17% e ambas 51%), também observaram que o desenvolvimento de lesão ulcerativa na região aglandular é mais prevalente que a glandular ao realizar estudos com animais utilizados para atividades recreativas (LUTHERSSON et al., 2009). Portanto, parece haver um consenso na literatura de que em condições de estresse, a região aglandular da mucosa gástrica equina é mais sensível a desenvolver úlceras (ANDREWS et al., 1999; BEGG; O'SULLIVAN, 2003; LUTHERSSON et al., 2009; MURRAY, 1994; MURRAY et al., 2001).

Esta dissimilaridade na prevalência na formação de lesões entre as duas regiões do estômago (glandular e aglandular) dos cavalos pode estar correlacionada à diferença das respectivas túnicas mucosas na produção de muco e/ou de outros fatores intrínsecos de proteção, uma vez que a mucosa aglandular (onde a formação de lesões ocorre com maior frequência) é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, não possui glândulas mucosas e possui poucos mecanismos de barreira contra o contato do ácido com o epitélios, sendo assim, apresenta limitada capacidade de prevenção aos danos causados por essa substâncias (ANDREWS et al., 1999; MURRAY, 1992; MURRAY; MAHAFFEY, 1993). Por outro lado, a mucosa glandular possui vários e mais eficazes mecanismos de defesa tais como secreção de muco e bicarbonato (barreira muco-bicarbonato), produção de prostaglandina, maior fluxo sanguíneo na região, e a presença do fator de crescimento epidermal (encontrado na saliva) (BELL; MOGG; KINGSTON, 2011).

Contudo, apesar dos mecanismos de defesa da mucosa aglandular parecerem pouco eficientes, autores destacam as junções intercelulares (junções célula-célula '*tight junctions*' uma a barreira fraca contra ácido - estrato córneo) e o sistema intracelular e intercelular de tamponamento (presença de muco substância) como os principais mecanismos de proteção da

mucosa gástrica equina aglandular (ANDREWS et al., 1999; MARTINEAU; THOMPSON; TAYLOR, 2009). Além disso, a espessura do tecido epitelial da mucosa aglandular e a camada de queratina também são citados como possíveis mecanismo de barreira contra as ações agressivas do ácido clorídrico. Murray e Mahaffery (1992), analisando o desenvolvimento da mucosa gástrica aglandular de potros de 2 a 35 dias, observaram que durante algumas semanas ocorreu aumento na espessura de todas as camadas epitelial e aumento da camada de células queratinizada da mucosa aglandular (MURRAY; MAHAFFEY, 1992).

A úlcera é uma doença complexa e de acordo com Brooks (1987), existem cinco explicações gerais para a degradação da mucosa gástrica e a formação de lesões: Quebra da barreira da mucosa gástrica causando difusão inversa do íon hidrogênio; falha no metabolismo normal no tamponamento dos íons hidrogênio na superfície epitelial; isquemia local; falha na secreção normal de bicarbonato e muco e intensa morte celular ou diminuição da proliferação celular (BROOKS, 1987).

No caso da mucosa gástrica aglandular dos equinos os principais fatores apontados como causadores de lesões são: a exposição prolongada da mucosa gástrica ao ácido clorídrico, ácidos graxos voláteis, pepsina e ácido biliar (ANDREWS et al., 1999; NADEAU et al., 2003; MURRAY, 1994). Enquanto as principais causas do desenvolvimento de ulcerações na região glandular são: a diminuição do fluxo sanguíneo na região, a baixa produção de bicarbonato e a utilização de anti-inflamatórios não esteroidais por longo período. (ANDREWS; NADEAU, 1999; MURRAY, 1994; MCCLURE, 2005).

No entanto, o desbalanço entre os processos de morte e proliferação celular também parece ser um fator bastante relevante para o desenvolvimento de úlceras. A integridade da mucosa gástrica depende do balanço entre o processo de renovação celular e morte celular por danos ou pela idade (TARNAWSKI et al., 2001). O tecido que constitui a mucosa gástrica apresenta uma taxa de renovação elevada, no entanto quando a morte celular excede o processo de renovação, esse pode resultar na formação de úlceras (MURRAY; EICHORN; JEFFREY, 2001). Consequentemente, o equilíbrio entre esses dois processos é de grande importância para manutenção da mucosa gástrica e para a cicatrização das lesões ulcerativas (TARNAWSKI, et al., 2001).

O mecanismo de cicatrização do tecido consiste em uma sequência de eventos altamente orquestrada no qual envolve migração, proliferação e re-epitelização resultando na correção da lesão. (SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2004). Uma das proteínas que atua indiretamente na recuperação do epitélio (proliferação de precursores epiteliais) é a proteína PCNA (antígeno nuclear de célula proliferativa) que participa dos processos de reparo e

replicação ou duplicação do DNA na fase S (síntese) do ciclo celular (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). A PCNA é primordial para replicação das fitas de DNA e apesar de apresentar uma meia vida relativamente longa, a análise da sua expressão (por imuno-histoquímica) é amplamente utilizada em estudo relacionado com tumores e apresenta a vantagem de ser resistente às técnicas de fixação.

No caso da regulação da morte celular, esse processo pode ocorrer por dois mecanismos distintos: necrose (morte acidental) ou por apoptose (suicídio) (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). Sob condições fisiológicas normais, as células privadas de fatores de sobrevivência danificadas ou senescente são levadas a morte pelo mecanismo de morte programada (apoptose) (HYLAND, 2008). A apoptose pode ser ativada por duas vias distintas: extrínseca por meio de ligante à receptores de superfície (FAS), e a via intrínseca que está relacionada com a manutenção da permeabilidade da membrana mitocondrial (HYLAND, 2008).

O mecanismo de apoptose intrínseca inicia-se quando em situações de estresse ou lesões, são gerados sinais apoptóticos que induzem a inibição da atividade da proteína Bcl-2 (anti-apoptóticas) que posteriormente à uma série de eventos resulta na ativação da Caspase-3 (executora) (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

A caspase-3 é um membro da família cisteína ácido aspartato protease (Caspase) encontrada na forma de pró-enzima inativa que ao ser clivada produz de duas subunidades (grande e pequena) que induz proteases a quebrarem moléculas de DNA cromossômico e degradação proteica resultando em morte celular (AMELIO; SHENG; CECCONI, 2012).

Logo, o reconhecimento das taxas de proliferação e de apoptose (via intrínseca) entre os tipos celulares torna-se primordial para o entendimento morfofuncional da manutenção da integridade do epitélio aglandular da mucosa gástrica de equinos, visto que essa região é a mais acometida por lesões erosivas e ulcerativas.

Assim, nossa hipótese é que existe um padrão distinto da proliferação (mitose) e morte celular (apoptose) nas células do epitélio de revestimento pavimentoso estratificado da mucosa gástrica aglandular de equino, no qual:

(I) A taxa de proliferação é mantida em taxa basal (apesar de um maior estímulo de morte causado por fatores exógenos) e a apoptose é elevada em relação ao epitélio normal, resultando na formação das lesões e úlceras na mucosa gástrica aglandular de equino (apoptose sobressai a proliferação).

(II) Ou a taxa de proliferação está reduzida em relação ao controle e taxa apoptótica é mantida em taxa fisiológicas resultando na formação das lesões e úlceras.

Dessa forma, com o propósito de elucidar essas hipóteses e compreender como ocorre o desenvolvimento da úlcera gástrica equina na região aglandular (região mais afetada pela doença), foi feito (por meio de imuno-histoquímica) a análise da taxa de proliferação (utilizando anticorpo anti-PCNA), taxa de inibição de apoptose (utilizando anticorpo anti-BCL-2) e taxa de apoptose (utilizando anticorpo anti-caspase-3). Além disso, por ser uma enfermidade bastante prevalente entre os equinos, por ter efeitos deletérios na qualidade de vida do animal, influenciar de forma negativa o desempenho dos animais em atividades esportivas e gera gastos com medicamentos, se faz necessário maior compreensão sobre os desenvolvimentos das úlceras gástrica, e como a mucosa aglandular mostra-se mais sensível ao desenvolvimento dessas lesões (independente dos tipos de fatores causadores) analisar essa região parece ser de maior relevância para a compreensão da doença.

Os resultados deste estudo contribuirão no entendimento dos processos de manutenção da higidez do epitélio da mucosa gástrica aglandular de equinos, podendo auxiliar no desenvolvimento de técnicas de prevenção e tratamento da úlcera gástrica nesses animais e talvez ajudar no tratamento.

## **7 CONCLUSÃO**

Os processos apoptóticos parecem não possuir um papel importante na formação e manutenção da úlcera gástrica em equinos, pelos resultados que obtivemos neste estudo. Portanto, a formação da úlcera na mucosa aglandular do estômago de equinos ocorre provavelmente devido a outro tipo de morte não apoptótica. Possivelmente o aumento de morte por necrose é a causa da úlcera gástrica em equinos. O aumento da proteína Bcl-2 possivelmente inibiu a morte celular por apoptose na tentativa de diminuir a perda celular e evitar o agravamento da lesão ou perda funcional do órgão.

A hipótese da inibição da taxa de proliferação celular (hipótese II) não foi confirmada com as análises realizadas neste estudo, ao contrário, houve um aumento da taxa de proliferação no tecido ulcerado acompanhada de redução de apoptose, indicando que os mecanismos de reparação de lesões estavam presentes e atuantes nas regiões ulceradas, assim a hipótese I também não foi confirmada, uma vez que a taxa de apoptose diminuiu ao invés de aumentar nas lesões. A constatação de que os mecanismos de reparação estão presentes e atuantes nos

leva a supor que o principal problema para a maior prevalência das úlceras em equinos não sejam as alterações nestes mecanismos de reparação locais na espécie. Possivelmente o problema esteja na agressão continuada e persistente ao epitélio estomacal por métodos inadequados de manejo que já se mostraram responsáveis por estas lesões, como a alimentação inadequada e regimes de trabalho e exercício causadores de estresse. Assim, o foco para encontrar a solução para o problema nas úlceras frequentes dos equinos deveria se dirigir antes à prevenção que ao tratamento, levando em conta as necessidades reais da espécie criadas pela domesticação.

## REFERÊNCIA

- AMELIO, M. D.; SHENG, M.; CECCONI, F. Caspase-3 in the central nervous system : beyond apoptosis. **Trends in Neurosciences**, v. 1, p. 1–10, 2012.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose : uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37–58, 2007.
- ANDREWS, F. et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of equine gastric ulcer syndrome (EGUS). **Equine Vet Educ**, v. 11, p. 262–272, 1999.
- ANDREWS, F. M.; NADEAU, J. A. Clinical syndromes of gastric ulceration in foals and mature horses. **Equine veterinary journal. Supplement**, v. 29, p. 30–33, 1999.
- ANDREWS, F. M. et al. Gastric ulcers in horses Gastric ulcers in horses 1. **J. Anim. Sci**, v. 83, p. 18–21, 2005.
- ARANZALES, J. R. M.; ALVES, G. E. S. O estômago equino: agressão e mecanismos de defesa da mucosa. **Ciênc. rural**, Santa Maria, v.43, n.2, p.305-313, fev, 2013
- BANCROFT, J.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6th. ed. Churchill Livingstone, Elsevier, 2008, p.71.
- BEGG, L. M.; O’SULLIVAN, C. B. The prevalence and distribution of gastric ulceration in 345 racehorses. **Aust. Vet. J.**, v. 81, n. 4, p. 199–201, 2003.
- BELL, R. J. W.; MOGG, T. D.; KINGSTON, J. K. Equine gastric ulcer syndrome in adult horses: a review. **New Zealand veterinary journal**, v. 55, n. 1, p. 1–12, 2007.
- BROOKS, F. P. The pathophysiology of peptic ulcer disease. **Digestive diseases and sciences**, v. 30, n. 11 Suppl, p. 15S-29S, 1985.
- BUCHANAN, B. R.; ANDREWS, F. M. Treatment and prevention of equine gastric ulcer syndrome. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 19, n. 3, p. 575–597, 2003.
- CINTRA, A. G. DE C. **O cavalo: Características, Manejo e Alimentação**. 1ed. São Paulo: Roca, 2011, p. 10-11, 204-205.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- FRANDSON, R.D.; LEE WILKE, W.; FAILS, de A. **Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda**. ed. Guanabara Koogan, 2011, p.307,324-325.
- GREEN, D. R. Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. **Cell**, v. 121, n. 5, p. 671–674, 2005.
- GUNDERSEN, H.J.G., JENSEN, E.B.V., KIEUK., JENSEN J.; The efficiency of systematic

sampling in stereology—reconsidered. **J Microsc**, v.193, 199–211 1999.

GUPTA, S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Life Sciences**, v. 69, p. 2957–2964, 2001.

HARTMANN, A. M.; FRANKENY, R. L. A Preliminary Investigation Into the Association Between Competition and Gastric Ulcer Formation in Non-racing Performance Horses. **Jornal of equine veterinary science**, v. 1, p. 560–561, 2003.

HELPAP, B.; HATTORI, T.; GEDIGK, P. Repair of Gastric Ulcer A Cell Kinetic Study. **Virchows Arch Pathol Anat**, 392, 159-170, 1981.  
of Bonn, D-53

HINTZ, H.; CYMBALU K, N. Nutrition of the horse. **Annual review of nutrition**, p. 243–267, 1994.

HYLAND, K. M. Cell proliferation and its regulation. **University of California**, p. 1–57, 2007.

JIMENEZ, P. et al. Effects of extracellular pH on restitution and proliferation of rabbit oesophageal epithelial cells. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 545–552, 1999.

JONES M.S. et al. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. **Frontiers in Bioscience**, 303-309, 1999

KHADKA, R. **Global horse population with respect to breeds and risk status. 2010.** 69f. European Master in Animal Breeding and Genetics. Swedish University of Agricultural Sciences, Education and culture Erasmus Mundus, 2010.

KIERSZENBAUM, A.K; TRES, L.L. **Histologia e Biologia Celular uma Introdução a Patologia.** 3 ed. São Paulo: Elsevier, 2012, p. 45-49, 101-105.

KONTUREK, P. K. et al. Role of epidermal growth factor, prostaglandin, and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. **Gastroenterology**, v. 99, n. 6, p. 1607–1615, 1990.

KONTUREK, P. C. Expression of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor Alpha during Ulcer Healing: Time Sequence Study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 32n. 1, p. 6-15, 2009. DOI: 10.3109/00365529709025056

KRAJEWSKI, S. et al. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. **The American journal of pathology**, v. 145, n. 6, p. 1323–36, 1994.

LAURINAVICIUS, A. et al. A methodology to ensure and improve accuracy of Ki67 labelling index estimation by automated digital image analysis in breast cancer tissue. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 1–13, 2014.

LUTHERSSON, N. et al. Risk factors associated with equine gastric ulceration syndrome (EGUS) in 201 horses in Denmark. **Equine veterinary journal**, v. 41, p. 625–630, 2009.

MARTINEAU, H.; THOMPSON, H.; TAYLOR, D. Pathology of gastritis and gastric ulceration in the horse. Part 1: range of lesions present in 21 mature individuals. **Equine veterinary journal**, v. 41, p. 638–644, 2009.

MCCLURE, S. R. et al. Gastric ulcer development in horses in a simulated show or training environment. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 5, p. 775–7, 2005.

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA**, Regulamento Técnico sobre o Abate Humanitário de Animais de Açoque” além da Circular Ministerial de no. 028/98/DCI/DIPOA.

MORAES, P. T. D. B. et al. Análise morfométrica da transição esôfago-gástrica de equinos submetidos a diferentes manejos alimentares e atividade física. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 5, p. 1325–1328, 2008.

MURRAY, M. J.; GRODINSKY, C. Gastric ulcers in horses: a comparison of endoscopic findings in horses with and without clinical signs. **Equine Veterinary Journal**, n. 7, p. 68–72, 1989.

MURRAY, M.J. Etiopathogenetic and treatment of peptic ulcer in the horse: a comparative review. **Equine Veterinary Journal**, v.13, 63-74, 1992.

MURRAY, M. J.; MAHAFFEY, E. Age-related characteristics of gastric squamous epithelial mucosa in foals. **Equine veterinary journal**, v. 25, n. 6, p. 514–517, 1993.

MURRAY, M. J.; SCHUSSER, G. F. Measurement of 24-h gastric pH using an indwelling pH electrode in horses unfed, fed and treated with ranitidine. **EQUINE VETERINARY JOURNAL Equine Vet.J.**, v. 25, n. 5, p. 417–421, 1993.

MURRAY, M. J. Equine model of inducing ulceration in alimentary squamous epithelial mucosa. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 39, n. 12, p. 2530–2535, 1994.

MURRAY, M. J. et al. Factors associated with gastric lesions in Thoroughbred racehorses. **Equine veterinary journal**, v. 28, p. 368–374, 1996.

MURRAY, M. J.; EICHORN, E. S.; JEFFREY, S. C. Histological characteristics of induced acute peptic injury in equine gastric squamous epithelium. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, p. 554–560, 2001.

NADEAU, J. A. et al. Evaluation of diet as a cause of gastric ulcers in horses. **Am J Vet Res**, v. 61, 784–790, 1996.

NADEAU, J. A. et al. Effects of hydrochloric, acetic, butyric, and propionic acids on pathogenesis of ulcers in the nonglandular portion of the stomach of horses. **Am J Vet Res**, 64,404–412, 2003.

NEUZIL, J. et al. Molecular mechanism of 'mitocan'-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins. **FEBS**

**letters**, v. 580, n. 22, p. 5125–9, 2 out. 2006.

NIEDŹWIEDŹ, A.; KUBIAK, K.; NICPOŃ, J. Endoscopic findings of the stomach in pleasure horses in Poland. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 55, p. 45, 2013.

PARKER, R. **Equine Science**. 3rd ed. New York: Cengage Learning, 2008, p. 6-23.

PILLINER, S.; DAVIES, Z. **Equine Science**. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2004, p.12.

RIBEIRO, M.DE R.; HILBIG, A. The Role of Apoptosis, Cell Proliferation Index, Bcl-2, And P53 in Glioblastoma Prognosis, **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62(2-A) p.262-270,2004.

ROBIRISON D.W.; SLADE L.M. The Current Status of Knowledge on the Nutrition of Equine. **Journal of Animals Science**, vol. 39, n. 6, 1045-1066, 1974

ROY, M. A. et al. Prevalence of ulcers of the squamous gastric mucosa in standardbred horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 5, p. 744–750, 2005.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in gastric ulcer healing. Effect of a selective cox-2 inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, v. 505, n. 1–3, p. 187–194, 2004.

SLACK, J. M. W. Stem Cells in Epithelial Tissues. **Sciences**, v. 287, n. February, p. 1431–1434, 2000.

SUSNOW, N.; ZENG, L.; MARGINEANTU, D.; HOCKENBERY, D. M. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. **Seminars in Cancer Biology**, v.19,n. 1, p. 42–49,

TARNAWSKI, A. et al. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. **Journal of Physiology Paris**, v. 95, n. 1–6, p. 337–344, 2001.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos Cavalos**. 5ª ed., São Paulo: Varela, 2005.

TOLOSA, DE E.M.C., RODRIGUES, O.J., BEHMER, NETO, A. G. DE F. **Manual de Técnicas Para Histologia Normal e Patológica**, 2003 Manole, 2ed

VIDELA, R.; ANDREWS, F. M. New Perspectives in Equine Gastric Ulcer Syndrome. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 25, n. 2, p. 283–301, 2009.

WARD, S. et al. A comparison of the prevalence of gastric ulceration in feral and domesticated horses in the UK. **Equine Veterinary Education**, v. 27, n. 12, p. 655–657, 2015.

WAGNER, S. et al. Regulation of gastric epithelial cell growth by Helicobacter pylori: offence for a major role of apoptosis. **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 1836–47, 1997.

YAMAGUCHI, T. et al. Gastric epithelial cell proliferation and apoptosis in Helicobacter pylori-infected mice. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 14 Suppl 1, p. 68–73, 2000.

YE, Y. N. et al. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. **Life Sciences**, v. 72, n. 8, p. 925–932, 2003.