

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRESSE OXIDATIVO EM EQUINOS
SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTRALUMINAL DO
CÓLON MENOR**

**Antonio Fernando Bariani Junior
Médico veterinário**

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRESSE OXIDATIVO EM EQUINOS
SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTRALUMINAL DO
CÓLON MENOR**

Antonio Fernando Bariani Junior

Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

Coorientadora: Dra. Kamila Gravena

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área: Clínica Médica Veterinária

2015

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: "ESTRESSE OXIDATIVO EM EQUINOS SUBMETIDOS À
OBSTRUÇÃO INTRALUMINAL DO CÓLON MENOR"**

AUTOR: ANTONIO FERNANDO BARIANI JUNIOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE CORREA DE LACERDA NETO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. KAMILA GRAVENA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOSE CORREA DE LACERDA NETO

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ALCEU AFONSO JORDÃO JUNIOR

Universidade de São Paulo / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 26 de novembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANTONIO FERNANDO BARIANI JUNIOR- filho de Antonio Fernando Bariani e Marisa Eduardo dos Santos Bariani, nascido na cidade de Ribeirão Preto-SP, em 06 de março de 1984, Médico Veterinário formado pelo Centro Universitário Barão de Mauá (CUBM) em Ribeirão Preto, em dezembro de 2009. Realizou o programa de aprimoramento em medicina veterinária na área de clínica médica e cirurgia de Grandes animais do Centro Universitário Barão de Mauá, no período de 2010 a 2012. Possui pós-graduação lato sensu em anestesiologia pelo Instituto Brasileiro de Veterinária (IBVET) no ano de 2012. Trabalhou como Médico Veterinário responsável pelo setor de anestesiologia do hospital veterinário da Fundação Educacional de Ituverava durante o ano de 2012. Em agosto de 2013 ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária- Unesp Jaboticabal, sob orientação do Prof. José Corrêa de Lacerda Neto e co-orientação da Dra. Kamila Gravena.

Invictus

Do fundo desta noite que persiste
A me envolver em breu - eterno e espesso,
A qualquer deus - se algum acaso existe,
Por mi'alma insubjugável agradeço.

Nas garras do destino e seus estragos,
Sob os golpes que o acaso atira e acerta,
Nunca me lamentei - e ainda trago
Minha cabeça - embora em sangue - ereta.

Além deste oceano de lamúria,
Somente o Horror das trevas se divisa;
Porém o tempo, a consumir-se em fúria,
Não me amedronta, nem me martiriza.

Por ser estreita a senda - eu não declino,
Nem por pesada a mão que o mundo espalma;
Eu sou dono e senhor de meu destino;
Eu sou o comandante de minha alma.

William Ernest Henley

Dedico este trabalho aos meus pais pelo amor, compreensão, apoio e ensinamentos. A minha esposa Amanda (Nanda) que além do amor e companheirismo, sempre apoia as minhas loucuras. A minha avó (Fofa) *in memoriam* que antes de todos sempre acreditou em mim. A meu avô (Dinor) *in memoriam*, quanta falta uma pessoa de estatura pequena pode fazer no mundo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Correa de Lacerda Neto (Prof. Juca) por me aceitar como orientado por mais de uma vez, por me mostrar a importância de um trabalho apesar da minha relutância, pela paciência, ensinamentos, dedicação e principalmente pela amizade.

À Dra. Kamila Gravena por aceitar ser minha coorientadora, pela ajuda e atenção não importando o dia que fosse, pela confiança, pelos ensinamentos, pelos conselhos e principalmente pela amizade

Ao Prof. Dr Alceu Afonso Jordão Junior por abrir as portas de seu laboratório, pela ajuda com conselhos na confecção deste trabalho e atenção.

Às técnicas Paula Payao e Livia Ambrosio, do Laboratório Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, que além de me ensinar o trabalho no laboratório, sempre estiveram a disposição para me ajudar e pela amizade.

Ao Laboratório Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, local onde as análises referentes ao estresse oxidativo foram desenvolvidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo-FAPESP por financiar a pesquisa (processo nº 2009/07284-9)

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP- Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade oferecida.

À Prof. Dra. Lina Maria Wehrle Gomide, pela amizade, ensinamentos, atenção, ajuda e por me incentivar a entrar na pós-graduação.

À Profa. e ex-orientadora de aprimoramento, Luciana Cristina Carrenho Sala, pelos ensinamentos, amizade, confiança, preocupação e por mudar a minha visão como profissional.

Aos amigos de pós-graduação: Edmilson, Nara, Beatriz, Vinicius, Karina, Daniela, Roberta, pela amizade e ajuda.

À todos os meus familiares de sangue ou espírito, pelo apoio.

Aos grandes amigos Walder, Prof. Gustavo, Celso, Sr. Rocha, Vinicius, Sr Zé, Edito, Valtair e Beto in memoriam, pela amizade (a única coisa que se leva dessa vida são os amigos que ficam gravados no peito)

Aos componentes da minha banca de qualificação Prof. Dr. Paulo Alécio Canola e Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi dos Santos, pela contribuição.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA	III
RESUMO	XII
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 ANIMAIS.....	12
3.2 PREPARO DOS EQUINOS.....	13
3.3 EXAME FÍSICO.....	13
3.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO.....	14
3.5 CELIOTOMIA E OBSTRUÇÃO INTRALUMINAL.....	14
3.6 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO SANGUE VENOSO.....	15
3.7 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO CÓLON MENOR	16
3.8 CUIDADOS PÓS-CIRÚRGICOS.....	16
3.9 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	17
3.10 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS DO SORO.....	17
3.11 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO TECIDO	18
3.12 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS.....	20
3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	20
4.RESULTADOS.....	22
4.1 PARÂMETROS CLÍNICOS	22
4.2 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	25
4.3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SORO.....	32

4.4	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO CÓLON MENOR	36
4.5	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO CÓLON MENOR	37
4.6	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO CÓLON MENOR	38
5.	DISCUSSÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
6.	CONCLUSÃO	50
7.	REFERÊNCIAS.....	26



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 007568-09 do trabalho de pesquisa intitulado **"Respostas inflamatórias intestinais, cutâneas e podais em equinos submetidos à distensão do cólon descendente"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião ordinária de 22 de abril de 2009.

Jaboticabal, 27 de abril de 2009.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEBEA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEBEA

ESTRESSE OXIDATIVO DE EQUINOS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTRALUMINAL DO CÓLON MENOR

RESUMO - A síndrome cólica um dos distúrbios de maior importância em equinos, a se destacar entre suas causas os quadros obstrutivos, decorrentes de corpos estranhos e ou enterólitos localizados no cólon menor. No desenvolvimento da cólica há diminuição do fluxo sanguíneo local ao qual se segue, quando de sua correção, a reperfusão sanguínea. A isquemia seguida de reperfusão é a causa do aumento da lesão degenerativa principal pós-cirúrgica. As lesões de reperfusão podem ser causadas pela produção e liberação de espécies reativas de oxigênio(EROs). Diante disto, objetivou-se no presente trabalho analisar moléculas decorrentes da oxidação celular e substâncias antioxidantes no soro e no tecido do cólon menor em equinos submetidos experimentalmente a obstrução intraluminal do cólon menor. Também foram avaliados parâmetros físicos frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (Tr), motilidade, tempo de preenchimento capilar (TPC), coloração de mucosas, pulso digital e turgor cutâneo. Análises hematimétricas e leucométricas foram efetuadas em diferentes momentos. Análises no soro para determinação de malondialdeído (MDA), produto protéico de oxidação avançada (AOPP) (metabólitos da oxidação), glutathiona (GSH) e vitamina E (Vit. E) (substâncias antioxidantes), foram realizadas em diferentes momentos: M0 (momento antes do procedimento anestésico e precursão da obstrução), M4 (4 horas, retirada da obstrução), M12, M24, M36, M48, M60 e M72 (correspondendo a 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após a obstrução). No cólon menor foram obtidas amostras em M0 (antes da obstrução), após 4 horas de obstrução intestinal (M4) foram obtidas na região oral, obstruída e aboral. Após 72 horas de pós cirúrgico (M72) realizou-se nova coleta das regiões do cólon menor. Nestas amostras de tecido foram realizadas as análises de MDA, AOPP, GSH e catalase. Nos parâmetros fisiológicos observou-se aumento significativo da FC e Tr em M12, e aumento da FR em M24. Na avaliação hematológica observou-se diminuição em relação a contagem de hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e plaquetas, em M4 com posterior aumento em M12, e nova diminuição em M48 com exceção das plaquetas que se mantiveram sem alteração. Já nas análises leucométricas, foi observado aumento de leucócitos em M12 e M24, sendo que esta ocorreu principalmente pelos neutrófilos bastonetes e segmentados. No soro observou-se aumento do GSH ($p < 0,05$) em relação ao basal registrado a partir de 24 horas, mantendo-se elevado até 48 horas. A Vit E aumentou ($p < 0,05$) 48 horas após o basal e persistiu até 72 horas. Nas amostras de tecido não foi observado diferença significativa. Portanto, pode-se concluir que a metodologia empregada com a finalidade de induzir quadro de cólica e lesões a parede do colón menor mostrou-se efetiva. No entanto, embora houvesse uma resposta oxidativa, não foi observado quadro de estresse

oxidativo, uma vez que o aumento de agentes antioxidantes no soro se mostrou eficiente na neutralização dos radicais livres produzidos pela isquemia.

Palavras Chaves: malondialdeído, glutathione, vitamina E, espécies reativas do oxigênio, indicadores de oxidação, antioxidantes, cavalo, cólica

OXIDATIVE STRESS FOR HORSES SUBMITTED TO OBSTRUCTION SAMLL COLON

ABSTRACT - The syndrome colic one of the most important disorders in horses, stand out among its causes obstructive frames, resulting from foreign bodies and or enteroliths located in the lower colon. The development of colic there is reduced local blood flow which follows, when their correction, blood reperfusion. The ischemia followed by reperfusion is the cause of increased postoperative primary degenerative injury. Reperfusion injury can be caused by the production and release of reactive oxygen species (ROS). In view of this, the aim of the present study to analyze molecules resulting from cellular oxidation and antioxidants in serum and lower colonic tissue in horses submitted to experimental intraluminal obstruction of the lower colon. They also evaluated physical parameters heart rate (HR), respiratory rate (RR), rectal temperature (Tr), motility, capillary refill time (TPC), color of mucous membranes, digital pulse and skin turgor. Hematological analysis and leukocytes were made at different times. Analysis of serum for determination of malondialdehyde (MDA) and vitamin E (Vit E), protein product of advanced oxidation (AOPP) (oxidation metabolites), glutathione (GSH) (antioxidant flux), were held at different times: M0 (time before the anesthetic and procedure obstruction), M4 (4 hours, removal of the obstruction), M12, M24, M36, M48, M60 and M72 (corresponding to 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours after occlusion). In the lower colon samples were obtained from M0 (before blocking) after 4 hours of intestinal obstruction (M4) were obtained in the oral region and aboral obstructed. After 72 hours of post surgical (M72) held new collection regions of the lower colon. In these tissue samples were carried out analysis of MDA, AOPP, catalase and GSH. In physiological parameters we observed a significant increase in HR and Tr in M12, and an increase in RR in M24. Hematological evaluation showed a decrease compared to red blood cell count (He), hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht) and platelets in M4 with subsequent increase in M12, and further reduction in M48 with the exception of platelets that remained without change. Already in leukocytes analysis, WBC increase was observed at M12 and M24, and this occurred mainly by neutrophils. In the serum was observed increase of GSH ($p < 0.05$) compared to baseline recorded starting 24 hours, remaining increase until 48 hours. The Vit E increased ($p < 0.05$) after 48 hours and initial persisted until 72 hours. All tissue samples there was no significant difference. Therefore, it can be concluded that the methodology used for the purpose of inducing colic above and lower colonic wall lesions showed effective. However, although there was an oxidative response, oxidative stress was observed above, since the increase in serum antioxidant agents proved efficient in neutralizing free radicals produced by ischemia.

Keywords: malondialdehyde, glutathione, vitamin E, reactive oxygen species, oxidation indicators, antioxidants, horse, colic.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Médias± erro padrão da média (EPM) das variáveis clínicas de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Jaboticabal, 2015.....	22
Tabela 2.	Médias± erro padrão da média (EPM) da contagem de hemácias (He, $\times 10^6/\mu\text{l}$), hemoglobina (Hb, g/dl), hematócrito (Ht, %) e plaquetas (Plaq, $\times 10^3/\mu\text{l}$) no sangue venoso de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Jaboticabal, 2015.....	25
Tabela 3.	Médias± erro padrão da média (EPM) da contagem de leucócitos totais e diferencial em valores absolutos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) no sangue venoso dos equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Jaboticabal, 2015.....	28
Tabela 4.	Médias ± erro padrão da média (EPM) das variáveis MDA (nmol/GP), GSH(micromol/GP), AOPP($\mu\text{mol/L}$), Vit. E ($\mu\text{mol/L}$) e Pt (g/mL), do soro de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Jaboticabal, 2015.....	32
Tabela 5.	Médias ± erro padrão da média (EPM) de AOPP (nmol/g tecido) de cólon menor de equinos no local da lesão, oral e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal, 2015.....	36
Tabela 6.	Médias ± erro padrão da média (EPM) de MDA (nmol/g tecido) de cólon menor de equinos no local da lesão, oral, balão e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal, 2015.....	37
Tabela 7.	Médias ± erro padrão da média (EPM) de GSH (nmol/g tecido) de cólon menor de equinos no local da lesão, oral, balão e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal, 2015.....	37
Tabela 8.	Médias ± erro padrão da média (EPM) de catalase (U/mgPT) de cólon menor de equinos no local da lesão, oral, balão e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal, 2015.....	37

Tabela 9.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de PT(g/gT) de colón menor de equinos no local da lesão, oral, balão e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal, 2015.....	37
------------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	23
Figura 2.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de frequência respiratória (FR) em movimentos por minuto de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	24
Figura 3.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de temperatura (TR) em graus celsius de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	24
Figura 4.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de hemoglobina (Hb) do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	26
Figura 5.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de hemácias (He) do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	26
Figura 6.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) do hematócrito (Ht) de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	27
Figura 7.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de plaquetas (Plaq) do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	27
Figura 8.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de leucócitos totais (Le) $\times 10^3/\mu\text{L}$ do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	29
Figura 9.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de eosinófilos (Eos) $\times 10^3/\mu\text{L}$ do sangue de equinos antes da indução anestésica	

	(M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	29
Figura 10.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de neutrófilos bastonetes (NB) $\times 10^3/\mu\text{L}$ do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	30
Figura 11.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de neutrófilos segmentados (NS) $\times 10^3/\mu\text{L}$ do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	30
Figura 12.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de linfócitos (Ln) $\times 10^3/\mu\text{L}$ do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	31
Figura 13.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de leucócitos totais (Le) $\times 10^3/\mu\text{L}$, neutrófilos bastonetes (NB) $\times 10^3/\mu\text{L}$ e neutrófilos segmentados (NS) $\times 10^3/\mu\text{L}$, do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	31
Figura 14.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de malondialdeído (MDA, em nmol/gP) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	33
Figura 15.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de produto proteico de oxidação avançada (AOPP, em $\mu\text{mol/L}$) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	33
Figura 16.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de proteínas (PT, em g/mL) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	34
Figura 17.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de glutathiona (GSH, em $\mu\text{mol/gP}$) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	34

Figura 18.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de vitamina E (Vit E, em $\mu\text{mol/L}$) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	35
Figura 19.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de glutathiona (GSH, em $\mu\text{mol/gP}$) e vitamina E (Vit E, em $\mu\text{mol/L}$) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	35
Figura 20.	Médias \pm erro padrão da média (EPM) de malondialdeído (MDA, em nmol/gP) e produto protéico de oxidação avançada (AOPP, em $\mu\text{mol/L}$) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	36
Figura 21.	Imagem fotográfica do cólon maior de equino, região balão/obstruída após quatro horas (M4), serosa apresentando regiões cianóticas.....	38
Figura 22.	Fotomicrografia ilustrando a camada mucosa do colón menor de equino submetido à obstrução intraluminal após quatro horas de indução (porção obstruída). Observa-se a ausência do epitélio luminal e a destruição da mucosa (setra). Hematoxilina-Eosina, obj 20x.....	39
Figura 23.	Fotomicrografia ilustrando as camadas muscularese serosa do colón menor de equino submetido à obstrução intraluminal após quatro horas de indução (porção obstruída). Observa-se hemorragia na camada muscular (setas) e hemorragia e edema na camada serosa(asteriscos). Hematoxilina-Eosina, obj 20x.....	40
Figura 24.	Fotomicrografia ilustrando as camadas mucosa do colón menor de equino submetido à obstrução intraluminal após 72 horas de desobstrução (porção obstruída). Observa-se o epitélio e a mucosa integros. Hematoxilina-Eosina, obj 20x.....	41
Figura 25.	Fotomicrografia ilustrando a camada submucosa do colón menor de equino submetido à obstrução intraluminal após 72 horas de desobstrução (porção obstruída). Observa-se a presença de infiltrado inflamatório, com presença de macrófagos e linfocitos (setas). Hematoxilina-Eosina, obj 40x.....	42

1. INTRODUÇÃO

A cólica é uma das enfermidades de maior ocorrência em equinos, na qual é considerada emergência uma vez que possui elevado potencial para levar os animais em óbito. Esta síndrome é de grande importância devido às perdas econômicas tanto pela morte do paciente como pelo elevado ônus do tratamento. A síndrome cólica é caracterizada por sinais clínicos de dor abdominal e possui etiologias variadas, sendo as de ocorrências do trato gastrointestinal de maior incidência. A cólica pode ser classificada em relação a sua causa, como obstrutiva simples, obstrutiva estrangulante, infartante não-estrangulante e inflamatória (peritonite, enterite). Na cólica obstrutiva irá ocorrer obstrução intra-luminal, sem que haja, inicialmente, desenvolvimento de isquemia. Com o passar do tempo e acúmulo de ingesta e líquido, ocorre aumento da pressão intraluminal sobre a parede da alça, promovendo compressão vascular e isquemia da região. Em sua grande maioria o tratamento preconizado é o cirúrgico, em especial, quando o processo é causado por corpos estranhos ou enterólitos. A avaliação da extensão da lesão deve levar em conta o tempo de evolução e o grau de comprometimento vascular. Apesar de no decorrer do ato cirúrgico, o aspecto da região afetada se encontrar pouco alterado, em muitos casos após a reparação da circulação, ocorre o aumento progressivo das lesões. Esse evento está associado à reperfusão tecidual causada pelo retorno do fluxo vascular, associado a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Ao entrarem em contato com moléculas presentes nas células as EROs provocam a sua oxidação e conseqüentemente lesão celular. Na tentativa de evitar estas lesões, tanto em eventos patológicos (isquemia) como em órgãos hígido (produção natural), o

organismo possui substâncias antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas com capacidade para neutralizar esses radicais livres. Quando ocorre o desequilíbrio entre os EROs e os agentes antioxidantes, a condição é denominada de estresse oxidativo, situação esta, que provoca a propagação das lesões. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de estresse oxidativo mediante a determinação de indicadores de oxidação (MDA e AOPP) assim como de indicadores antioxidantes (GSH e vit. E), antes, no momento da desobstrução e após a reperfusão do colón menor de equinos, assim como determinar possíveis alterações clínicas e laboratoriais (hematimétricas e leucométricas). Adicionalmente efetuou-se avaliações histopatológicas da região oral, aboral e obstruída (balão) do colón menor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A cólica é um termo referente a sinais clínicos de dor abdominal, podendo ter etiologias diversas. Nos equinos ela está, em grande parte, associada a patologias do trato gastrointestinal, mas o acometimento de outros órgãos da cavidade abdominal como os rins, útero, fígado e o próprio peritônio, podem também levar a esse quadro clínico (TRAUB-DARGATZ, 2001; RADOSTITS et al., 2002; CORRÊA et al., 2006). A dor pode ser atribuída a distensão do trato gastrointestinal e conseqüentemente estimulação de receptores de tensão localizados na parede da alça e a distensão do mesentério devido a encarceramentos e/ou deslocamentos (RADOSTITS et al., 2002).

Existem vários sistemas de classificação, podendo ser quanto a duração da doença, em aguda (menos de 24 a 36 horas), crônica (mais do que 24 a 36 horas) e recidivantes (vários episódios, intercalados com pelo menos 2 dias de normalidade). Também podem ser classificados com relação a causa, em obstrutiva, obstrutiva estrangulante, infartante não estrangulantes e inflamatória (RADOSTITS et al., 2002), sendo que a cólica causada por obstrução intestinal foi apontada como uma das principais causas de internação e óbitos de equinos em hospitais veterinários (FALEIROS et al., 2007).

A obstrução intestinal simples está associada a presença intraluminal de massa obstrutiva, formada através de compostos da alimentação, por corpos estranhos responsáveis pela formação de enterólitos (BLIKSLAGER, 2009). Os enterólitos são concreções formadas ao redor de um núcleo constituído de um corpo estranho (prego, pedra ou madeira) sobre o qual se depositam camadas concêntricas de fosfato de amônio e magnésio (estruvita). Estas estruturas

intraluminares podem apresentar formato: irregular, esférico, elíptico ou nodular. O formato e a localização do enterólito irão influenciar o quadro clínico, ou seja, enterólitos de superfície grosseira e situados no cólon maior e ceco podem gerar sinais clínicos de dor leve, já os maiores e de superfícies regulares localizados em paredes mais estreitas geram sinais mais graves. Os principais pontos de obstruções causados por enterólitos são: cólon transversal, cólon menor, cólon dorsal direito, flexura diafragmática e reto (CORRÊA, 2006). Inicialmente, esta massa não promove obstrução sanguínea, mas à chegada de mais ingesta, há desequilíbrio entre a absorção e secreção e acúmulo intraluminal de fluidos e gases. Em consequência do acúmulo de conteúdo alimentar e secreções há aumento da pressão intraluminal e intramural do seguimento, levando a diminuição do suprimento de sangue e a formação de áreas isquêmicas (RUF et al., 1980; WHITE, ROWE, 2002; BLIKSLAGER, 2009). Os enterólitos formados em regiões de maior diâmetro podem mover-se com a motilidade intestinal para regiões de menor diâmetro e assim promover a obstrução e comprimir diretamente a parede intestinal gerando isquemia e até a necrose mural (BLIKSLAGER, 2009).

Na maioria das vezes as veias são ocluídas primeiro do que as artérias, devido, de um lado, a menor espessura da parede das veias e, de outro, a menor pressão dentro do lúmen. Com isto, o fluxo sanguíneo arterial ainda se mantém, a promover lesão hemorrágica. Enquanto as artérias continuam a prover as células com sangue rico em oxigênio, as veias se encontram em estase/congestão. Quando o aumento de pressão atinge o ponto crítico, ocorre então a oclusão das artérias e o agravamento da isquemia (RUF et al., 1980; BLIKSLAGER, 2009).

Inicialmente, após a diminuição do fluxo sanguíneo, é observada a ocorrência de hiperemia tanto na camada mucosa como na seromuscular do cólon, em decorrência da liberação de calcitonina e peptídeos a promover leve relaxamento da musculatura vascular. Na tentativa de manter o fluxo sanguíneo e a pressão em resposta, ocorre vasoconstrição. Isso é observado tanto após a retirada da obstrução na reperfusão, como na fase inicial da obstrução. O dano causado ao endotélio das artérias e veias resulta na perda de agentes vasodilatadores derivados do endotélio, deixando os vasos mais

suscetíveis à ação de vasoconstritores. Os danos causados no endotélio das veias do cólon acabam resultando na perda dos agentes contrateis derivados do endotélio (endotelina), o que pode acabar diminuindo o fluxo de sangue e conseqüentemente aumentando o acúmulo na circulação venosa (WHITE, 2002).

A manutenção adequada da perfusão se faz necessária seja para a entrega de oxigênio (O_2) e nutrientes imprescindíveis ao metabolismo celular seja para remoção de resíduos oriundos deste metabolismo. As células tem capacidade de resistir a diminuição de O_2 , tanto pela reserva que possuem deste gás como pelo aumento na capacidade de extração. Quando essa capacidade é suplantada, devido ao fluxo baixo de sangue ou pela ocorrência de aumento do metabolismo celular podem ocorrer lesões celulares estruturais e/ou metabólicas (MOORE, MUIR, GRANGER, 1995; WHITE, ROWE, 2002). A gravidade da lesão gerada depende tanto da duração quanto da magnitude, ou seja, o comprometimento do fluxo, sendo esse parcial no envolvimento somente de veias ou total no acometimento tanto de veias como de artérias (BLIKSLAGER, 2009).

O maior consumo de oxigênio ocorre na mitocôndria, onde este é utilizado como aceptores de elétrons a formar água. Este processo ocorre junto com a formação de andenosina-trifosfato (ATP), principal fonte de energia da célula. A falta de oxigênio provoca falha na fosforilação oxidativa e conseqüentemente diminuição na produção de ATP. No caso de déficit de O_2 ativa-se as vias anaeróbicas de produção de energia, como forma de manter o metabolismo celular (MOORE, MUIR, GRANGER, 1995). Esta forma de obtenção de energia leva ao aumento de ácido láctico e de íons hidrogênio no interior da célula. O aumento na concentração intracelular de prótons causa acidose celular e inibição na produção de ATP (MOORE, MUIR, GRANGER, 1995; WHITE, ROWE, 2002). As proteínas de membranas responsáveis pelo controle do influxo de íons passam a falhar devido a falta de energia, ocasionando acúmulo de íons e inchaço celular. Este acúmulo de íons altera algumas reações celulares a permitir o aumento de cálcio intracelular o qual, por sua vez ativa fosfolipases. Estas enzimas promovem a degradação da membrana fosfolipídica liberando ácidos graxos e promovendo alterações

celulares. Com a manutenção da isquemia, o pH intracelular continua diminuindo pelo acúmulo de íons hidrogênio (H^+), provocando perda de carga negativa, alterações na estrutura e na função de enzimas e proteínas reguladoras. No conjunto, estes fenômenos são responsáveis por dano e morte celular (MOORE, MUIR, GRANGER, 1995).

A propagação da lesão causada pelo retorno da oxigenação, aos tecidos, um fato a princípio contraditório, ocorre em decorrência de reações bioquímicas deletérias (MOORE, MUIR, GRANGER, 1995; BLIKSLAGER, 2009). Segundo White (2002), é desencadeada uma reação inflamatória progressiva que pode chegar até a necrose do tecido. O retorno do fluxo sanguíneo frente a isquemia é necessário para que se mantenha a função das células, a reparação de componentes danificados e a manutenção do tecido. Acreditava-se que este promoveria o resgate das possíveis lesões já instaladas. No entanto, o retorno vascular e de oxigênio, inicia a sequência de eventos que promovem aumento desta lesão (MOORE, MUIR, GRANGER, 1995; BLIKSLAGER, 2009). Isso ocorre devido ao acúmulo de elétrons que saem das mitocôndrias e ficam disponíveis ao retornar o fluxo vascular e do oxigênio, resultando em formação de radicais livres de oxigênio (WHITE, ROWE, 2002).

Os radicais livres são moléculas oriundas do metabolismo celular que possuem em sua última órbita um elétron não pareado. Estas moléculas possuem a característica de serem instáveis e muito reativas. Desse modo, a sua produção ocorre tanto em organismo hígido como em acometidos por eventos patológicos. Alguns radicais livres, derivados do metabolismo do oxigênio, não possuem um elétron não pareado na última órbita, o que caracterizaria estabilidade a molécula. Mesmo assim, levam a oxidação de outras moléculas, passando a ser denominados como espécies reativas de oxigênio (EROs) (FERREIRA, 1997; KIRSCHVINK, MOFFARTS, LEKEUX, 2008). As EROs são moléculas que possuem o oxigênio em sua estrutura, mas que são mais oxidantes do que este sozinho (MACHADO, 2009; DIAS, 2012).

Além das EROs, outro grupo que pode gerar a oxidação são os radicais oriundos do nitrogênio (ERN), que possuem a molécula de nitrogênio como átomo central (DAVID, 2006). A produção em excesso destas moléculas pode

levar a oxidação dos componentes das células, ou seja, a perda de um elétron dos componentes das células para as EROs ou ERN. Dentre os componentes que podem sofrer essa reação encontramos os lipídeos, proteína e ácidos nucléicos (MOORE, MUIR, GRANGER, 1995; FERREIRA, 1997; MACHADO, 2009; DIAS, 2012;). Algumas dessas moléculas oxidantes podem reagir com qualquer componente da célula, já outras reagem somente com lipídeos e algumas que são pouco reativas, podem originar moléculas mais reativas (DAVID, 2006). Após a oxidação de uma molécula pertencente a célula, esta pode acabar se tornando uma molécula reativa e provocar a oxidação de outra molécula, perpetuando a oxidação (FLAHERTY, 1988). Portanto, passou a ser estudado os mecanismos bioquímicos que levam a produção desses radicais livres para melhor esclarecimento das fisiopatogênias das enfermidades (DIAS, 2012).

Para que não corra a oxidação dos componentes da célula o organismo possui substâncias consideradas antioxidantes. O desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e o sistema antioxidante leva a ocorrência de estresse oxidativo (LYKKESFELDT, SVENDSEN, 2006; MACHADO, 2009).

Os radicais livres podem ser de origem endógena ou exógena, sendo o órgão considerado mais importante pela formação exógena é o pulmão. Já os de origem endógenos podem ser divididos pela sua origem: oriundos da mitocôndria em que a transferência de elétrons acaba normalmente gerando água e uma porcentagem de 1-3% de superóxido (O_2^-); os dependentes de enzimas como a xantina oxidase e através de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, que irão fazer parte da resposta imune não específica contra microrganismos (KIRSCHVINK, MOFFARTS, LEKEUX, 2008).

Normalmente o O_2 dentro da mitocôndria sofre redução tetravalente através da enzima catalisadora citocromo oxidase no final da cadeia respiratória, formando água. Os radicais gerados na mitocôndria, sem a ocorrência de uma patologia ou outro evento como esforço físico, acabam representando entorno de 2-5% do oxigênio que é metabolizado por essa organela, isso ocorre devido ao desvio para outras vias metabólicas reduzindo de forma univalente e gerando os radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

A xantina oxidase é a possível responsável pelas lesões da mucosa pós isquêmicas no intestino delgado. A xantina oxidase é uma enzima presente no citosol da célula e sua maior parte no tecido se encontra na forma de xantina desidrogenase, que esta ligada a nicotiamina dinucleotideo (NAD) (White, 2002). Na isquemia, a diminuição da produção de ATP faz com que a célula utilize suas reservas, levando a produção de adenosina monofosfato (AMP) que é catabolizada em adenosina e inosina, que são catabolizadas em hipoxantina pela xantina desidrogenase, resultando no acúmulo de hipoxantina (PRICHARD. 1991). O cálcio acumulado dentro da célula em conjunto com a calpaina, converte a xantina desidrogenase em xantina oxidase com o retorno do oxigênio, a hipoxantina é catalisada pela xantina oxidase resultando em ácido úrico e na formação de superóxido (O_2^-). A molécula de superóxido desmutase converte esta molécula em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode deixar a mitocôndria, sendo posteriormente transformado pela catalase em $H_2O + O_2$. Eventualmente o H_2O_2 , devido a sua produção e sobrecarga sobre o sistema antioxidante, pode reagir com o ferro, cobre ou outros metais, sendo convertido em radical hidroxil (OH^-) (MATOS, 2000; WHITE, 2002).

O H_2O_2 é um metabólito parcialmente reduzido do oxigênio. Por não possuir elétrons desemparelhados ele não é um radical livre ou potente agente oxidante, mas possui a habilidade de se difundir facilmente a membrana hidrofóbica, como a mitocondrial, e possui tempo de vida longo (YU, 1994; FERREIRA, 1997; BARBOSA et al., 2010). Este metabólito pode originar substâncias altamente oxidantes, dentre elas o radical hidroxil (OH^-) e o ácido hipocloroso (HOCl) (MOORE, MUIR, GRANGER, 1995; DIAS, 2012). O H_2O_2 reage somente com as proteínas que possuem resíduos de metionina ou grupos tiol, assim como o glutathiona (GSH) (DAVID, 2006).

O radical hidroxil (OH^-) e o anion superóxido (O^-) são alguns dos mais reativos dentre os radicais, podendo causar alterações em enzimas ou ácidos nucleicos como DNA, lipoperoxidação de membranas celulares levando a perda da sua integridade e conseqüentemente danos nos tecidos (MOORE, MUIR, GRANGER, 1995; DIAS, 2012). As EROs podem causar aumento de lesão ao tecido isquêmico, mas estes também podem transportados pela

circulação e ocasionarem lesões celulares em outros órgãos, da mesma forma que ocorre no local isquêmico. Dentre os órgãos que apresentam lesão pela circulação das EROs observamos principalmente os pulmões, em que passam a apresentar lesões em alvéolos, infiltrado neutrofílico e aumento de permeabilidade vascular (MAUREEN ; MOORE, 2004)

O superóxido pode originar varias outras EROs, como peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e peróxido. Também pode reagir com óxido nítrico(NO) produzindo peroxinitrito (ONOO^-). Em pH neutro ou elevado é catalisado pela superóxido desmutase (YU, 1994; DAVID, 2006). Nas células de defesas como linfócitos ou fagócitos pode ser produzido com o auxilio da enzima NADPH oxidase, que catalisa a redução do O_2 com o gasto de uma molécula de NADPH. Esse radical superoxido produzido dentro das células de defesa possui efeito bactericida fraco, mas serve como substrato para moléculas mais reativas e com forte atividade antimicrobiana como o ácido hipocloroso (HOCl), o peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito (DAVID, 2006).

A avaliação direta das EROs é dificultada pela baixa concentração encontrada e pela elevada velocidade de reação. Portanto utiliza-se os subprodutos das EROs (FERREIRA, 1997). Para se avaliar os agentes oxidantes existem duas formas, direta e ou indiretamente. A primeira é feita através do monitoramento da ressonância da rotação dos elétrons. Já a maneira indireta é quantificando as moléculas oriundas da oxidação utilizando espectrofotômetros. Uma das moléculas utilizadas para avaliação é o malondialdeído (MDA). O MDA é um aldeído, subproduto da degradação de lipídios pela peroxidação lipídica (LYKKESFELDT, SVENDSEN, 2007).

Assim como os lipídeos, as proteínas e aminoácidos sofrem oxidação por diversos radicais livres, gerando o produto protéico de oxidação avançada (AOPP), o qual é utilizado para a avaliação da oxidação protéica. In vitro, utilizando-se plasma ou albumina humana, conseguiu-se elevar o valor obtido de AOPP através da adição de ácido hipocloroso, sendo esse um dos radicais livres responsáveis pela oxidação de proteínas (WITKO, 1996).

A produção constante e continua de radicais livres, resulta no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidantes (BARBOSA et al., 2010). Este sistema de defesa inativa ou transforma um radical livre em uma

molécula menos reativa tentando diminuir os efeitos deletérios dos oxidantes (KIRSCHVINK, MOFFARTS, LEKEUX, 2008; MACHADO ET AL., 2009). As substâncias antioxidantes agem em diferentes estágios da sequência oxidativa. Elas podem agir diminuindo a concentração de oxigênio local, catalisando e removendo íons de metais, removendo EROS (superóxido e peróxido de hidrogênio), realizam a limpeza inicial de radicais hidroxil e espécies de peróxido e quebrando a sequência inicial da cadeia. Apesar desta divisão, uma substância antioxidante pode agir em mais de um estágio (GUTTRIDGE, 1995).

Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos, no entanto, apesar desta divisão estes trabalham juntos e sinergicamente na tentativa de conter os radicais livres de uma possível lesão. Na classe dos antioxidantes enzimáticos dentre os mais eficientes encontramos a glutatona peroxidase (GSH-px), a catalase e a superóxido desmutase (SOD). Já na classe dos não enzimáticos encontramos a glutatona (GSH), as Vitaminas E e C, melantonina, carotenóides e flavanóides naturais (RAHMAN, 2007; FERREIRA, CAROCHO, 2013;). Outra proposta de classificação divide as substâncias antioxidantes com relação a resposta de defesa, sendo uma primária e outra secundária. Fazem parte da resposta primária as vitaminas E, A e C, GSH e ácido úrico. Já na resposta secundária estão as proteases, exonucleases, enzimas proteolíticas e lipolíticas, as fosfolipases e peptidases (YU, 1994).

Os antioxidantes não encontram-se somente no citosol da célula, eles também são encontrados dentro da mitocôndria, sendo que os principais antioxidantes encontrados em ambas são: SOD, catalase e GSH-px. Junto com os antioxidantes intracelulares, trabalhando em conjunto, temos os antioxidantes encontrados no plasma, sendo os mais importantes: GSH, vitamina E, GSH-px, SOD, catalase, ceruloplasmina e transferrina (YU, 1994).

O GSH é uma molécula de tripeptídeo (-glutamil-cisteinil-glicina), constituindo o antioxidante mais importantes encontrados dentro das células devido a sua versatilidade em interagir com diversos radicais livres. Além de ser encontrado em concentrações elevadas, é responsável por realizar a conversão de peróxido de hidrogênio em água. Também compete com a catalase pela redução do peróxido de hidrogênio e é a molécula que realiza

maior neutralização em níveis baixos de estresse oxidativo (RAHMAN, 2007; JI, 1999; GUTTRIDGE, 1995; YU, 1994). O GSH em conjunto com duas enzimas, a GSH-px e a glutathiona redutase (GSH-rd) opera em ciclos entre a forma oxidada e a reduzida. Na presença de H_2O_2 , através da enzima GSH-px sofre redução, transformando em água e em sua forma oxidada (GSSG), em seguida é reduzida através da enzima GSH-rd e retorna a sua forma reduzida GSH (BARBOSA, 2010; DAVID, 2006).

A Vitamina E é um componente dos óleos vegetais, encontrada em quatro formas, sendo o principal grupo dos α -tocoferol, uma molécula lipossolúvel. Fora da membrana possui pouca efetividade antioxidante, mas é muito eficiente se ligada a membrana. Devido a este fato, encontra-se ligada junto as membranas das células e sua principal função é prevenir a peroxidação lipídica (RAHMAN, 2007; GUTTRIDGE, 1995). A sua aquisição ocorre através da ingestão e absorção pelo intestino delgado em sua forma não esterificada, sendo carregada pela circulação linfática até as células hepáticas. Portanto a vitamina E é secretada pelo fígado (JORDAO-JUNIOR, CHIARELLO, BERNARDES, VANNUCCHI, 1998). Agem como doadoras de H^+ para os agentes oxidantes, tentando interromper a reação (David, 2006). Além de inibir a reação oxidativa da membrana, é responsável por impedir a propagação da reação em cadeia da oxidação dos lipídios de membrana (BIANCHI, ANTUNES, 1999). Uma molécula de tocoferol pode reagir com até dois radicais peroxila, no entanto isso provoca a sua desativação de forma irreversível. Para que a vitamina E não se desative é necessário a sua regeneração sinérgica que na membrana ocorre pela molécula de ascorbato e na mitocôndria pela molécula de ubiquinona (BARREIROS, DAVID, 2006). Além do efeito antioxidante também possui os seguintes efeitos fisiológicos, alteração da fluidez da membrana celular, aumento da imunidade, redução da agregação plaquetária e formação de coágulos (JORDAO-JUNIOR, CHIARELLO, BERNARDES, VANNUCCHI, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho realizado está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária/ Unesp- Campus de Jaboticabal (Protocolo nº 007568-09).

3.1 Animais

Foram utilizados oito equinos adultos hígidos, sem raça definida, entre oito e quatorze anos de idade. Antes de iniciar o período experimental, os animais foram pesados e examinados clinicamente para avaliação de higidez, utilizando-se apenas animais sadios. Os animais passaram por programa de desverminação¹ e controle de ectoparasitas². Os equinos foram mantidos em baias individuais, nas dependências do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV/UNESP e receberam como alimentação diária: 1% do peso vivo em alimento volumoso, constituído de feno de Coast-cross (*Cynodondactylon*); 1% do peso vivo em ração balanceada; sal mineral e água *ad libitum*.

¹ Equalan®, Merial Saúde Animal LTDA. São Paulo, SP, Brasil

² Butox®P CE 25- Intrvet Brasil, Akzo Nobel LTDA. São Paulo, SP, Brasil

3.2 Preparo dos equinos

No dia anterior a cirurgia de obstrução intraluminal do cólon menor, os animais foram mantidos em troncos de contenção próprio para equinos para serem tricotomizados na região abdominal ventral, delimitado craniocaudalmente pelo xifóide e região púbis, e dorsoventralmente pela região paramediana ventral direita e esquerda. Posteriormente, foi realizado a cateterização da veia jugular externa esquerda (cateter mono lúmen 14G x 20 cm³) para facilitar as colheitas de sangue e também para posterior administração dos medicamentos e hidratação no período pós-cirúrgico.

Neste mesmo dia (momento zero, M0) colheu-se amostras de sangue venoso. Logo depois os equinos foram realocados nas baias e mantidos em jejum alimentar e hídrico de 24 e 12 horas, respectivamente, instituído previamente ao procedimento cirúrgico.

3.3 Exame Físico

Os equinos foram submetidos a exames físicos antes do procedimento cirúrgico (M0) e posteriormente, a cada 12 horas, até atingir 72 horas pós cirúrgica (M12, M24, M36, M48, M60, M72), observando-se, mediante auscultação torácica, as frequências cardíaca (determinada em batimentos por minutos, bpm) e respiratória (medida em movimentos por minuto, mpm); avaliando-se a perfusão das mucosas, classificadas de acordo com a coloração e com o tempo de preenchimento capilar por meio da compressão digital da mucosa gengival; apreciação da atividade intestinal mediante auscultação abdominal, determinando-se ausência de borborigmos, atividade intestinal diminuída, normal ou aumentada; avaliação do turgor cutâneo pela realização de pregueamento da pele na região lateral do pescoço com relação ao tempo de retorno a posição normal da pele e determinação da temperatura retal com a utilização de termômetro. Sinais clínicos característicos referentes a desconforto abdominal também foram avaliados durante os dias experimentais.

3.4 Procedimento Anestésico

O procedimento anestésico utilizado para a celiotomia constituiu na administração intravenosa de cloridrato de detomidina 10%³ (0,015mg/kg) como medicação pré-anestésica. Após 10 minutos, realizou-se a indução anestésica por meio da administração de cetamina 10%⁴ (2,0mg/kg) e logo após a administração de maleato de midazolam⁵ (0,1 mg/kg), levando o animal a atingir decúbito lateral esquerdo. Ato contínuo realizou-se intubação orotraqueal e posicionou-se o animal em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica. A anestesia inalatória foi mantida com isoflurano⁶ vaporizado em oxigênio, em circuito semi-fechado, sob ventilação controlada. Para manutenção da pressão arterial média (PAM) foi utilizado 0,002mg/kg/min de dobutamina⁷ durante todo o procedimento cirúrgico. Também foi administrado 5% do peso corpóreo de Ringer com lactato⁸ por dia (IV) para a manutenção da volemia.

3.5 Celiotomia e obstrução intraluminal

A intervenção cirúrgica ocorreu com os equinos em decúbito dorsal e antissepsia do campo cirúrgico com polivinilpirrolidona-iodo tópico a 10%. Para a realização da obstrução intraluminal do cólon menor realizou-se a celiotomia por meio de incisão mediana pré-umbilical. A escolha do segmento a ser manipulado foi realizada observando-se a presença de ramos da artéria mesentérica. A incisão para a introdução do balão foi realizada na borda antimesentérica da região aboral do segmento a ser distendido. Em seguida, o balão⁹ (de policloreto de vinilo com 13cm de diâmetro) foi introduzido no lúmen

³ Dormiun V®, Agener União Saúde Animal- Embu-Guaçu, SP, Brasil

⁴ Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda - Cotia, SP, Brasil

⁵ Dormonid®, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. - Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁶ Isoforine®, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. - Itapira, SP, Brasil

⁷ Cloridrato de dobutamina, NovaFarma Indústria Farmacêutica - Anápolis, Go, Brasil

⁸ JP Indústria Farmacêutica S.A. - Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁹ Water Polo Nabaiji

do cólon menor através da incisão e inflado com ar até atingir a pressão de 80 mm de Hg, medida por manômetro. Com o balão já inflado, realizou-se a enterorrafia com fio poliglactina 910 n° 2-0¹⁰. Ato contínuo, o segmento intestinal foi retornado à cavidade abdominal e a incisão da cavidade abdominal reduzida utilizando pinças allis.

Os animais foram mantidos em anestesia geral durante as quatro horas de duração da obstrução (4 horas). Após este período (M4), o cólon menor foi novamente exposto, o balão foi desinflado e removido do cólon menor. Posteriormente realizou-se enterorrafia e o segmento manipulado foi reintroduzido à cavidade abdominal. Em seguida foi realizado o fechamento da cavidade abdominal.

Todas as enterorrafias foram realizadas em dois planos, sendo a primeira camada com sutura de Schimieden e a segunda em padrão Cushing. A linha Alba foi suturada juntamente com o peritônio em padrão X empregando-se fio de nylon 0,60 agulhado com agulha 40x12¹¹. O tecido subcutâneo foi aproximado com sutura contínua padrão Cushing com fio de poliglactina 910 n°0¹², e a dermorrafia realizada em padrão Wolff também com fio nylon 0,60 agulhado com agulha 40x12.

3.6 Colheita e Processamento do sangue venoso

As amostras de sangue venoso foram obtidas pelo cateter implantado na veia jugular esquerda, antes da indução anestésica (M0), em M4 e posteriormente em intervalos de 12 horas durante o pós-cirúrgico até completar o intervalo de 72 horas (M12, M24, M36, M48, M60 e M72). As amostras foram depositadas em tubo de coleta a vácuo contendo EDTA (ácido etilenodiamonotetracético) para realização imediata da análise

¹⁰ Vicryl®, Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda. - São José dos Campos, SP, Brasil

¹¹ Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda. - Curitiba, PR, Brasil

¹² Vicryl®, Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda. - São José dos Campos, SP, Brasil

eritroleucométrica e em tubos a vácuo sem anticoagulantes para a retirada do soro e análise dos valores de proteína total, MDA, AOPP, GSH e Vitamina E.

3.7 Colheita e Processamento do Cólon Menor

As amostras de cólon menor foram coletadas antes da introdução do balão (M0), imediatamente 4 horas (M4) e 72 horas (M72) após a desobstrução. Em M0, o fragmento foi coletado no local da incisão efetuada para a introdução do balão, na borda antimesentérica. Já em M4 e M72, foram coletadas três amostras, também na borda antimesentérica, sendo a primeira no local da incisão de remoção da bola e, a segunda e a terceira na região aboral e oral da porção obstruída, respectivamente.

A coleta destas amostras foram efetuadas com tesoura de Mayo e pinça de dissecação com dente estéreis. Estas amostras apresentavam um centímetro de largura e dois centímetros de comprimento, sempre envolvendo uma porção da tênia. As enterorragias foram todas realizadas com fio de poliglactina 910 n° 2-0 como descritas anteriormente.

3.8 Cuidados pós-cirúrgicos

No período pós-cirúrgico, os animais receberam administração de ceftiofur¹³ (2,2mg/kg a cada 12 horas por via intravenosa), cloridrato de tramadol¹⁴ (1,1mg/kg a cada 6 horas dividindo o volume em administração por via intravenosa e por via intramuscular) e o butilbrometo de escopolamina¹⁵ (0,2 mg/kg a cada 6 horas por via intravenosa). Foi realizada anti-sepsia da ferida cirúrgica com polivinilpirrolidona-iodo tópico a 1% a cada 12 horas, até a cicatrização.

¹³ Minoxel 8G®, Lapisa, S.A. de C.V. - Guadalajara, Mexico

¹⁴ Tramal®, Laboratórios Pfizer Ltda. - Guarulhos, SP, Brasil

¹⁵ Buscopan®, Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda. - Itapeirica da Serra, SP, Brasil

3.9 Procedimentos laboratoriais

Das amostras coletadas com anticoagulante EDTA, foram aferidos os dados relativos às contagens de hemácias e leucócitos totais, plaquetas, teor de hemoglobina sanguínea e hematócrito em aparelho automático¹⁶. As contagens diferenciais dos leucócitos sanguíneos foram realizadas sobre esfregaços corados com May-Grunwald-Giemsa. Estes procedimentos foram efetuados no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

3.10 Avaliações bioquímicas do soro

A proteína foi determinada por meio de kit comercial (Labtest®) e foi realizada a leitura em espectrofotometro. A análise de MDA foi efetuada de acordo com o método proposto por Gerard-monnier et al, (1998) com algumas adaptações. Foram utilizados 200µl de soro diluídos em 650µl de solução de 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 150µl de HCL puro (37%). Em seguida, os microtubos foram agitados em vortex e incubados a 45°C por 40 minutos, para posterior resfriamento das amostras em gelo, seguida de centrifugação a (4000 rpm) por 10 minutos. Do sobrenadante realizou-se a leitura de absorbância com comprimento de onda de 586nm, determinando-se a concentração de MDA em comparação com a curva de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado.

Os valores de GSH foram obtidos por meio da técnica adaptada por Hu(1994), na qual uma alíquota de soro (25µl) foi diluída em 1 mL de Tris-EDTA (0.25mol/L Tris base, 0,20mol/L EDTA, pH 8.2) buffer, executando-se a leitura a 412 nm. Em seguida, uma alíquota de 25µl de 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) foi adicionado à solução. Após 15 minutos em temperatura ambiente realizou-se a leitura juntamente ao padrão DTNB.

¹⁶ Pock-100 iV Diff®, Sysmex do Brasil Indústria e Comércio Ltda. - São José dos Pinhais, PR, Brasil

Para a determinação dos valores de AOPP, foi adicionado o soro à solução PBS, seguida de mistura de 200µL de cloramina padrão, iodeto de potássio e 20µL de ácido acético puro. A leitura realizou-se a 340 nm. Para a determinação das concentrações da Vitamina E, foi utilizado protocolo proposto por Fabianek et al, (1968). Foram colocados em cada um tubo de ensaio 400µL de soro, 400µL da solução padrão de α -tocofenol (padrão) e 400µL de água(branco) , depois adicionou-se 400µL de etanol no tubo de ensaio contendo o soro e a água e 400µL de água no padrão e agitado em vortex por 30 segundos e centrifugar por 10 minutos a velocidade de 1.500 g a temperatura de 4°C. Foi coletado a camada hexânica (superior) e transferida para outro tubo de vidro. Em um microtubo de 0,2 ml foi pipetado na seguinte ordem: 200 µL da camada hexânica, 50 µL de batofenantrolina 0,4%, 150 µl de cloreto férrico 0,06% e 100 µL de ácido ortofosforico(85%), este foi agitado. O material foi lido em absorbância em 536 nm, utilizando-se o branco em uma cubeta de 0,5 ml para zerar, e aferindo o soro e α -tocofenol. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório Nutrição e Metabolismo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.11 Avaliação bioquímica do tecido

As amostras de cólon menor foram pesadas e padronizadas em uma faixa entre 0,15 a 0,2 g, sendo depois alocadas em microtubo de polipropileno tipo eppendorf de 2 ml e adicionou-se 700µl de buffer fosfato (H_2PO_4) e realizou-se a homogeneização do tecido. Após esta etapa, adicionou o restante de buffer fosfato para completar a proporção de 1:9 (gramas de tecido:ml de buffer fosfato). Em seguida, realizou a centrifugação a 4°C por 12 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi utilizado nas análises de GSH, MDA, AOPP, catalase e proteína total.

A análise de proteína do tecido foi determinada por meio de kit comercial labtest® e sua leitura realizada em espectrofotometro.

A análise do MDA foi realizada de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al.(1998), com algumas adaptações. Foi colocado 100 µl de

homogenato em microtubo, a este foi adicionado 300 µl de solução de 10 mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1 de volume) e 75 µl de HCL puro (37%). Logo após, os microtubos foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve resfriamento das amostras em gelo e em seguida foi centrifugado a 4000rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorvância com comprimento de onda de 586nm. A concentração de MDA foi calculada comparando-a a curva de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado.

Para o GSH foi colocado 25 µl do homogenato em microtubo, adicionado 2 ml de água milli Q e 0,5 ml de TCA 50% (ácido tricloroacético). Após 15 minutos foi agitado em vortex. Logo em seguida foi centrifugado a 4000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos, retirar-se 1 ml do sobrenadante para um tubo de vidro menor e adiciona 2 ml de TRIS-HCl 0,4 M pH 8,9 e 50µl de DTNB (ácido ditionitrobenzólico) em metanol. Aguarda-se 5 minutos e depois é realizada a leitura a 412 nm.

Para a realização do AOPP é colocado 50 µl do homogenato e adicionado 200 µl de PBS em cada tubo. Na placa é colocado 200 µl de PBS para o branco, 200 µl de solução padrão em duplicata e 200 µl de cada amostra. Adiciona-se 10 µl de iodeto de potássio (1,92g/10ml de PBS) em cada padrão. Logo após é adicionado 20 µl de ácido acético puro em cada poço e em seguida a leitura é realizada a 340 nm com filtro de referência de 490nm.

A catalase é realizada colocando-se 250 µl do homogenato com adição de 2,5 µl de Tritón X-100 puro. Logo após é agitado e retirado 10µl desta amostra e adicionado 2 ml de buffer fosfato. Com a utilização de uma cubeta, é colocado 2 ml desta amostra diluída e adiciona-se 1ml de H₂O₂. Realiza-se a leitura a 240nm em dois tempos(t=0 e t= 1 após 1 minuto). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório Nutrição e Metabolismo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.12 Procedimentos histológicos

As amostras de cólon menor, foram imersas, para fixação, durante 24 horas em formalina tamponada com fosfatos a 10%, em pH 7,2. Em seguida, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%), num período de 60 minutos cada. Na sequência, foram passadas três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol. A impregnação e inclusão em parafina foram efetuadas em duas incubações durante uma hora a 60°C. As amostras colhidas foram clivadas e incluídas transversalmente com as porções centrais do fragmento posicionadas mais externamente no bloco e em seguida armazenadas. Posteriormente, foram efetuados no micrótomo¹⁷ cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro lapidadas, os quais foram, em seguida, corados com hematoxilina-eosina (HE). O processamento das amostras foi realizado no laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo. Posteriormente, efetuou-se documentação fotográfica e análise histológica descritiva das lâminas. Foi utilizado microscópio óptico binocular¹⁸ e sistema fotográfico digital¹⁹.

3.13 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados por meio de Análise de Variância com medidas repetidas no tempo, em que o fator testado foram momentos (08 níveis), com os animais constituindo os blocos (08). Havendo diferença significativa entre as médias dos momentos ($p < 0,05$), estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey no mesmo nível de significância (5%). Para tanto, será utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do

¹⁷ Spencer 820, American Optical - New York, NY, EUA

¹⁸ Olympus BX51, Tokyo, Japão

¹⁹ Olympus DP72, Tokyo, Japão

Programa computacional SAS²⁰. Os dados obtidos estão apresentados como valores médios \pm erro padrão (EPM), na forma de tabelas e figuras.

²⁰ SAS 9.1, SAS Institute, Cary NC, USA

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros Clínicos

O tempo de preenchimento capilar (TPC), a motilidade intestinal, o turgor cutâneo, a coloração de mucosa e o pulso das artérias digital palmares não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$). Porém, observou-se que o TPC diminuiu inicialmente em 12 horas (M12), com posterior aumento em 60 horas (M60). A motilidade intestinal também apresentou alterações no decorrer do período experimental, apresentando-se diminuída logo após a cirurgia (M12), retornando aos valores basais 60 horas (M60) após a desobstrução do cólon menor.

Tabela 1. Médias \pm erro padrão da média (EPM) das variáveis clínicas de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Jaboticabal, 2015.

	M0	M12	M24	M36	M48	M60	M72
FC	41,00 \pm 3,25 ^b	55,25 \pm 4,17 ^a	46,25 \pm 2,99 ^{ab}	43,75 \pm 3,51 ^b	42,25 \pm 2,74 ^b	44,25 \pm 2,96 ^b	49,25 \pm 4,77 ^{ab}
FR	18,75 \pm 2,59 ^b	21,00 \pm 2,88 ^{ab}	31,50 \pm 6,99 ^a	16,25 \pm 1,62 ^b	22,75 \pm 3,36 ^{ab}	17,50 \pm 2,50 ^b	20,00 \pm 3,23 ^b
T _R	37,73 \pm 0,08 ^b	38,71 \pm 0,18 ^a	37,81 \pm 0,15 ^b	37,81 \pm 0,11 ^b	37,74 \pm 0,16 ^b	37,96 \pm 0,16 ^{ab}	37,73 \pm 0,15 ^b

FC (frequência cardíaca) em batimentos por minuto; FR (frequência respiratória) em movimentos por minuto; T_R (temperatura retal) em graus Celsius. Médias seguidas de mesmas letras na linha não diferem entre si ($p>0,05$).

À análise das variáveis clínicas foi possível observar diferenças significativas em frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (T_R). A FC aumentou 12 horas (M12) após o fim do procedimento cirúrgico ($p < 0,05$), retornando aos valores basais em 24 horas (M24) e observou-se ligeiro aumento ($p < 0,05$) após 72 horas (M72). A FR se elevou com 24 horas (M24) ($p < 0,05$) e retorno aos valores basais no momento 36 horas (M36). A T_R se elevou no momento 12 horas (M12) ($p < 0,05$) e retornou para os valores basais as 24 horas (M24) mantendo-se constante (Tabela 1, Figuras 1,2 e 3).

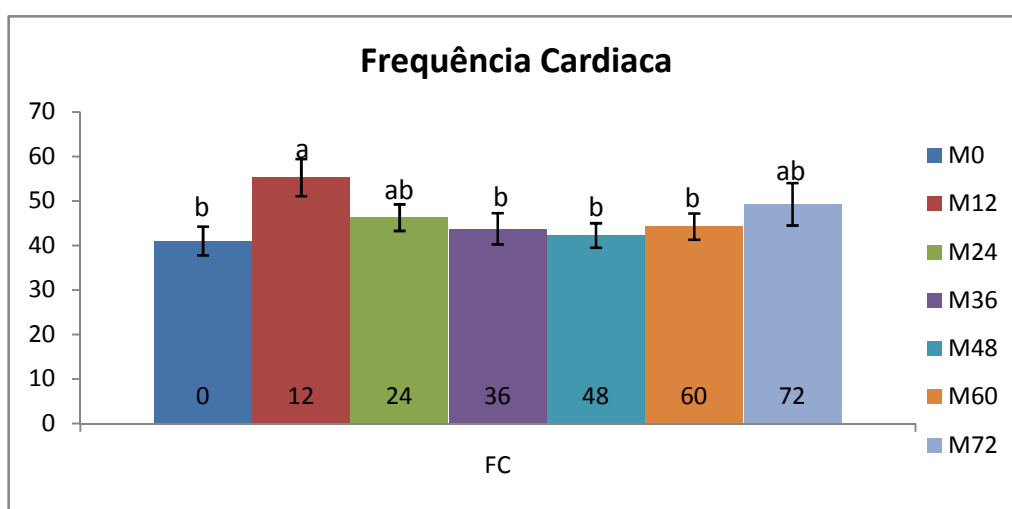


Figura 1. Média \pm erro padrão da média (EPM) de frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

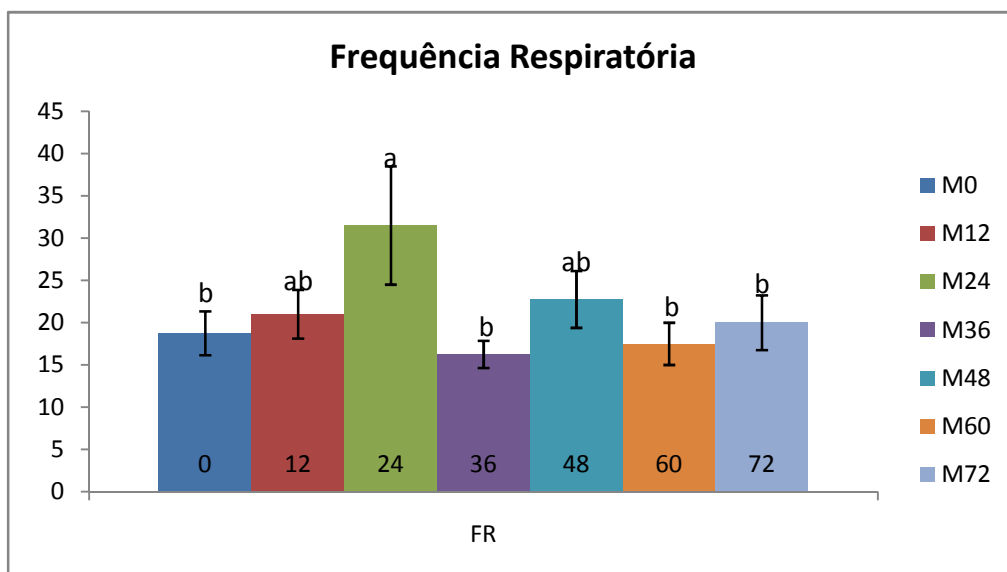


Figura 2. Média \pm erro padrão da média (EPM) de frequência respiratória (FR) em movimentos por minuto de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

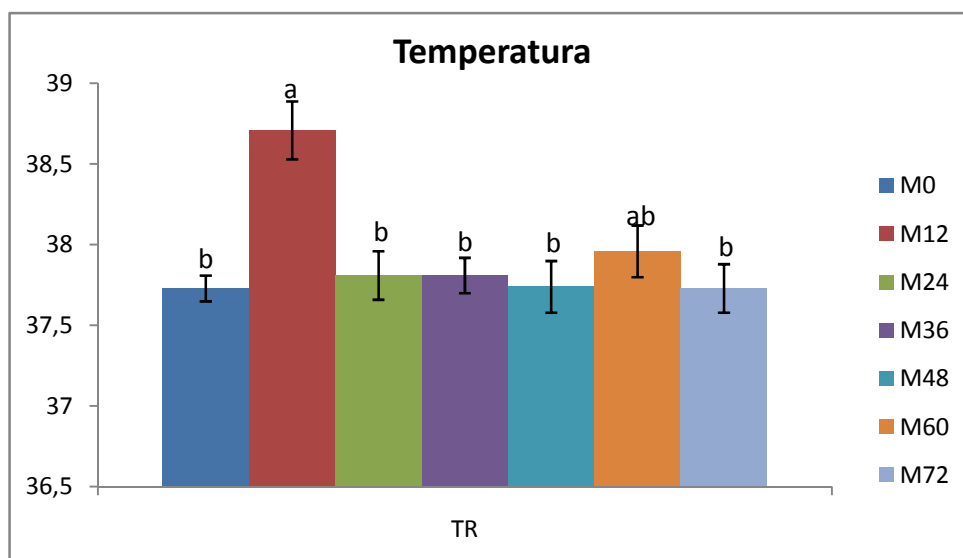


Figura 3. Média \pm erro padrão da média (EPM) de temperatura (TR) em graus celsius de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

4.2 Avaliação Hematológica

Na avaliação eritrocitária e de plaquetas não se observou diferenças significativas ($p < 0,05$) ao se comparar com M0. Porém ao ser comparado os momentos entre eles. Verificou-se em M4 discreta diminuição de hemoglobina, hematócrito, plaquetas e contagem de hemácias. Foi observado aumento no momento M12 ($p < 0,05$) na contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas. Apresentando um retorno aos valores basais em M24. Com 48 horas de desobstrução (M48) os valores referentes ao hematocrito, contagem de hemácias e hemoglobina obtiveram seus valores mais baixos, diferenciando-se significativamente de M12, mas não diferenciando-se do basal (M0) (Tabela 2, Figuras 4, 5, 6 e 7).

Tabela 2. Médias \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de hemácias (He, $\times 10^6/\mu\text{l}$), hemoglobina (Hb, g/dl), hematócrito (Ht, %) e plaquetas (Plaq, $\times 10^3/\mu\text{l}$) no sangue venoso de equinos submetidos à obstrução intraluminal do colón menor, antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Jaboticabal, 2015.

	M0	M4	M12	M24	M36	M48	M60	M72
He	7,56 \pm 0,32 ^{ab}	6,91 \pm 0,26 ^b	8,15 \pm 0,38 ^a	7,28 \pm 0,33 ^{ab}	7,24 \pm 0,32 ^{ab}	7,05 \pm 0,28 ^b	7,21 \pm 0,32 ^{ab}	7,27 \pm 0,4 ^{ab}
Hb	11,46 \pm 0,34 ^{ab}	10,50 \pm 0,65 ^b	12,33 \pm 0,49 ^a	11,05 \pm 0,34 ^{ab}	11,03 \pm 0,33 ^{ab}	10,69 \pm 0,29 ^b	10,94 \pm 0,33 ^{ab}	11,16 \pm 0,60 ^{ab}
Ht	35,41 \pm 1,08 ^{ab}	32,48 \pm 1,87 ^b	38,08 \pm 1,60 ^a	33,96 \pm 1,22 ^{ab}	33,79 \pm 1,11 ^{ab}	33,01 \pm 0,79 ^b	33,71 \pm 1,07 ^{ab}	34,18 \pm 1,94 ^{ab}
Plaq	241,14 \pm 9,88 ^{ab}	197,29 \pm 10,28 ^b	253,71 \pm 15,37 ^a	233,71 \pm 12,26 ^{ab}	236,86 \pm 14,56 ^{ab}	227,71 \pm 12,03 ^{ab}	218,86 \pm 17,44 ^{ab}	232,57 \pm 19,72 ^{ab}

Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ($p > 0,05$).

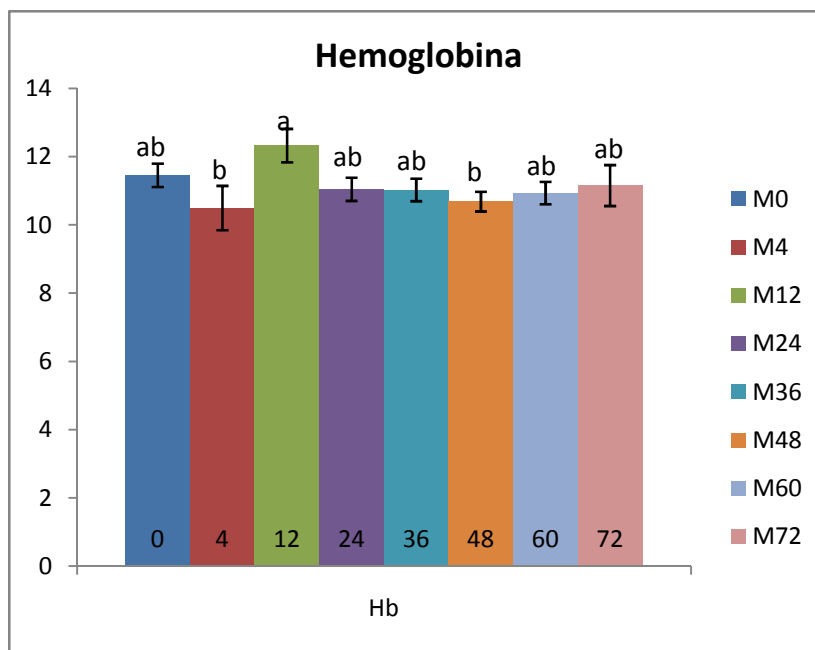


Figura 4. Média \pm erro padrão da média (EPM) de hemoglobina (Hb) do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

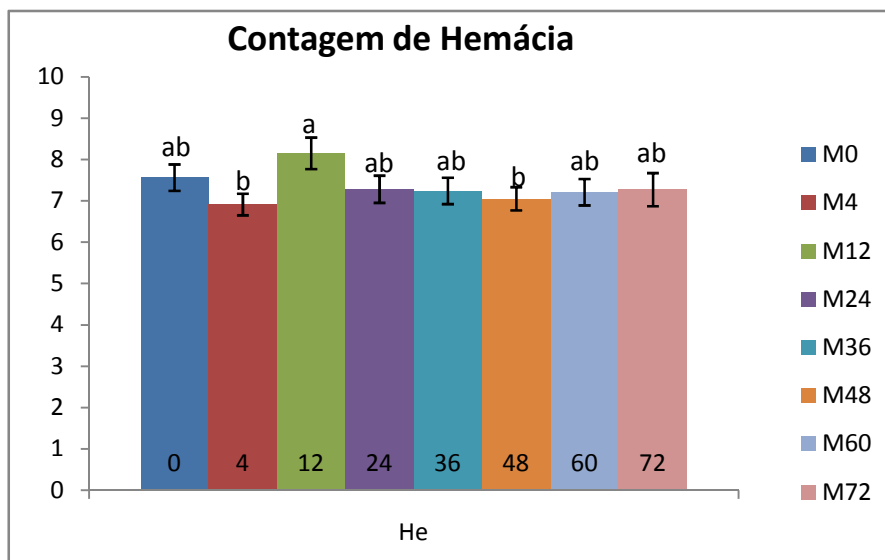


Figura 5. Média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de hemácias (He) de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

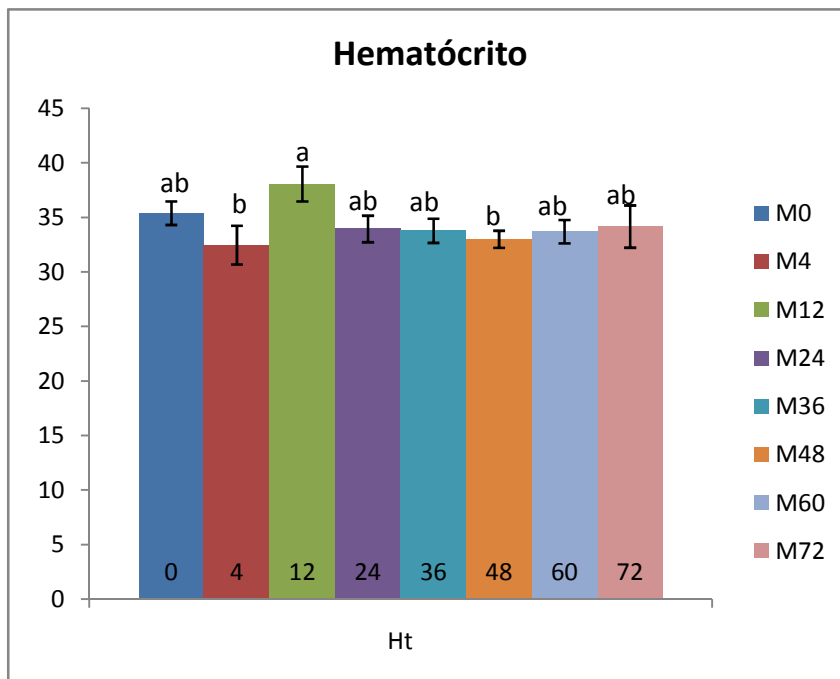


Figura 6. Média \pm erro padrão da média (EPM) do hematócrito (Ht) do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

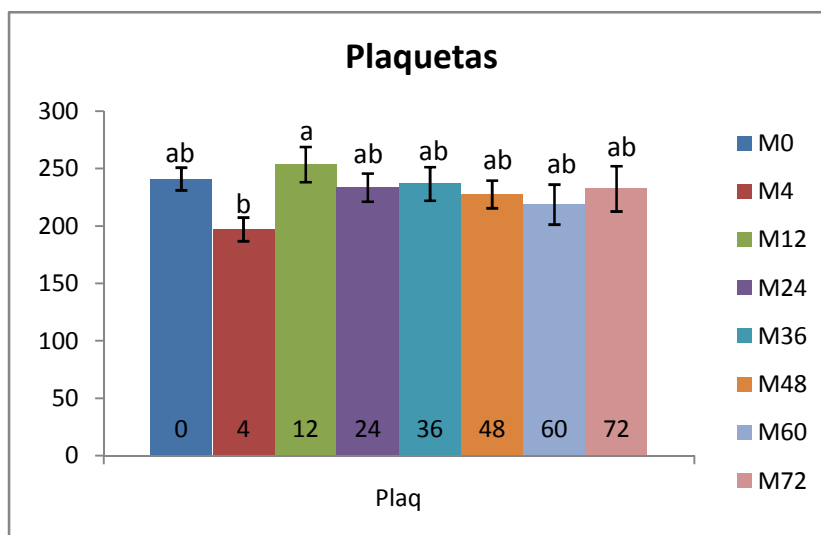


Figura 7. Média \pm erro padrão da média (EPM) de plaquetas (Plaq) do sangue de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Os valores de leucócitos totais obtidos no leucograma apresentaram aumento em M12 e M24 (p 0,05), diminuindo a partir de M36, mas permanecendo acima do valor obtido em M0 e ao longo dos outros momentos subsequentes, porém o aumento não foi significativo (p 0,05). Não foram encontradas diferenças entre os valores de basófilos e monócitos em nenhum momento. Em relação aos eosinófilos observou-se diminuição nos momentos M12, M24 e M36 (p 0,05), com aumento no momento M48 próximo ao valor basal (M0). Nos neutrófilos bastonetes observou-se aumento significativo (p 0,05) em M12 e M24, porém nos outros momentos não foram observadas diferenças. Os neutrófilos segmentados aumentaram (p 0,05) em M12, M24 e M36, retornando para valores próximos ao basal após 48 horas (M48). No entanto, em M60 houve novamente aumento (p 0,05) nos segmentados com retorno aos valores basais em M72. Já os linfócitos diminuíram (p 0,05) no intervalo entre M4 e M36, assim como em M60. Nos outros momentos os valores encontraram-se próximos aos valores basais (Tabela 3, Figuras 8, 9,10,11,12 e 13).

Tabela 3. Médias \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de leucócitos totais e diferencial em valores absolutos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue venoso dos equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Jaboticabal, 2015

	M0	M4	M12	M24	M36	M48	M60	M72
Le	9,69 \pm 0,37 ^c	9,79 \pm 0,57 ^c	16,50 \pm 1,27 ^a	13,70 \pm 1,01 ^{ab}	12,54 \pm 1,15 ^{bc}	12,31 \pm 1,56 ^{bc}	12,08 \pm 1,49 ^{bc}	10,79 \pm 1,10 ^{bc}
Eos	0,26 \pm 0,06 ^a	0,15 \pm 0,02 ^{ab}	0,05 \pm 0,05 ^b	0,02 \pm 0,02 ^b	0,05 \pm 0,03 ^b	0,28 \pm 0,08 ^a	0,33 \pm 0,11 ^a	0,30 \pm 0,10 ^a
NB	0,00 \pm 0,00 ^c	0,03 \pm 0,02 ^{bc}	0,85 \pm 0,19 ^a	0,23 \pm 0,04 ^b	0,00 \pm 0,00 ^c	0,00 \pm 0,00 ^c	0,05 \pm 0,03 ^{bc}	0,09 \pm 0,04 ^{bc}
NS	5,36 \pm 0,49 ^d	6,82 \pm 0,57 ^{cd}	13,00 \pm 1,12 ^a	10,79 \pm 1,17 ^{ab}	9,58 \pm 1,06 ^{bc}	8,60 \pm 1,37 ^{bcd}	8,71 \pm 1,25 ^{bc}	8,17 \pm 1,07 ^{bcd}
Ln	3,96 \pm 0,47 ^a	2,67 \pm 0,23 ^b	2,44 \pm 0,40 ^b	2,47 \pm 0,38 ^b	2,76 \pm 0,29 ^b	3,22 \pm 0,46 ^{ab}	2,73 \pm 0,35 ^b	2,93 \pm 0,43 ^{ab}

Le (leucócitos totais), Eos (eosinófilos), NB (neutrófilos bastonetes), NS (neutrófilos segmentados) e Ln (Linfócitos). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si (p>0,05).

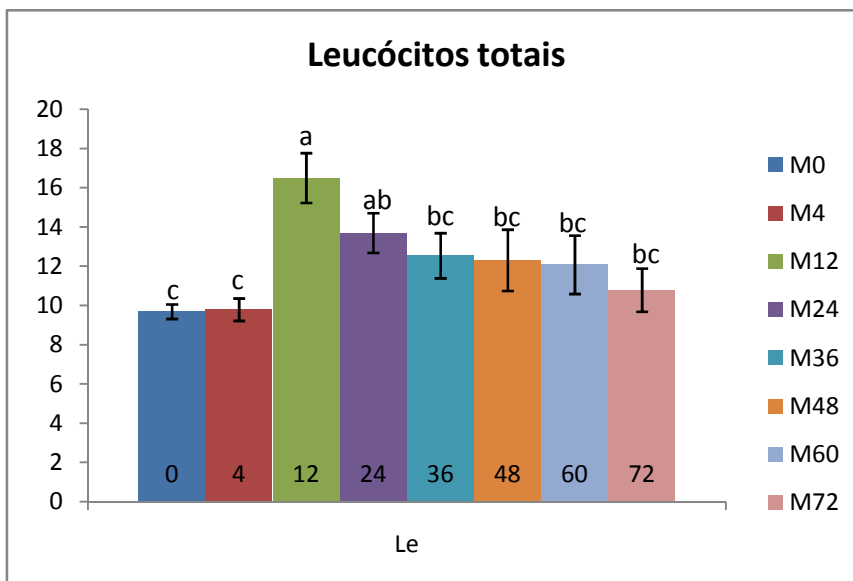


Figura 8. Média \pm erro padrão da média (EPM) de leucócitos totais (Le) $\times 10^3/\mu\text{L}$ de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

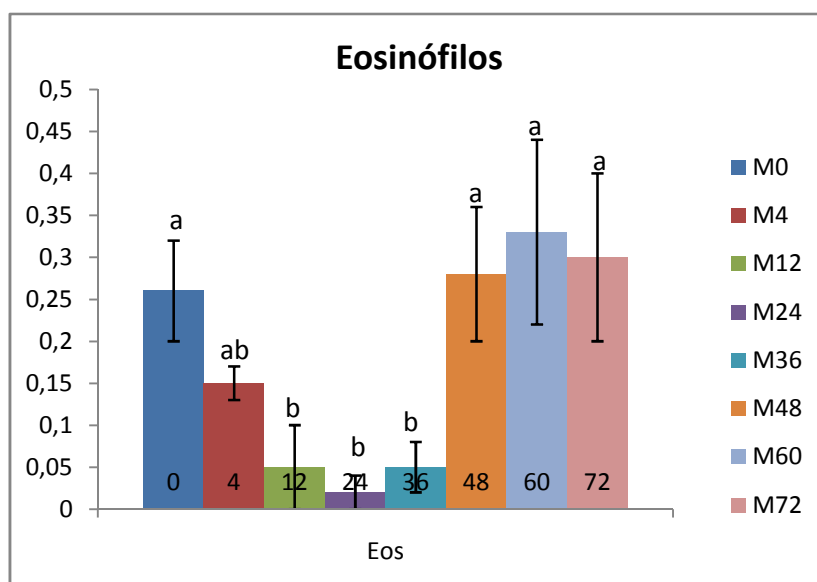


Figura 9. Média \pm erro padrão da média (EPM) de eosinófilos (Eos) $\times 10^3/\mu\text{L}$ de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

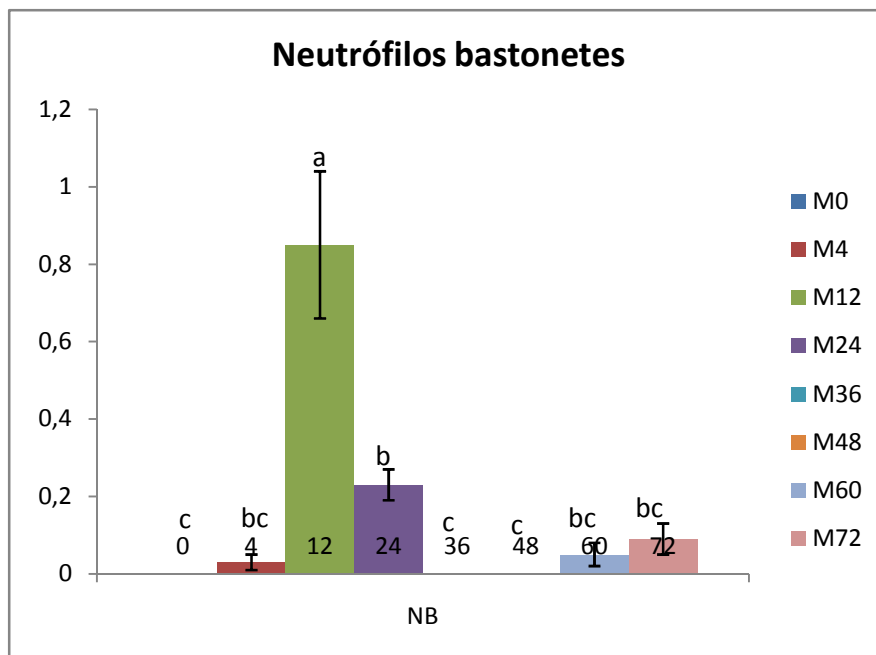


Figura 10 Média \pm erro padrão da média (EPM) de neutrófilos bastonetes (NB) $\times 10^3/\mu\text{L}$ de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

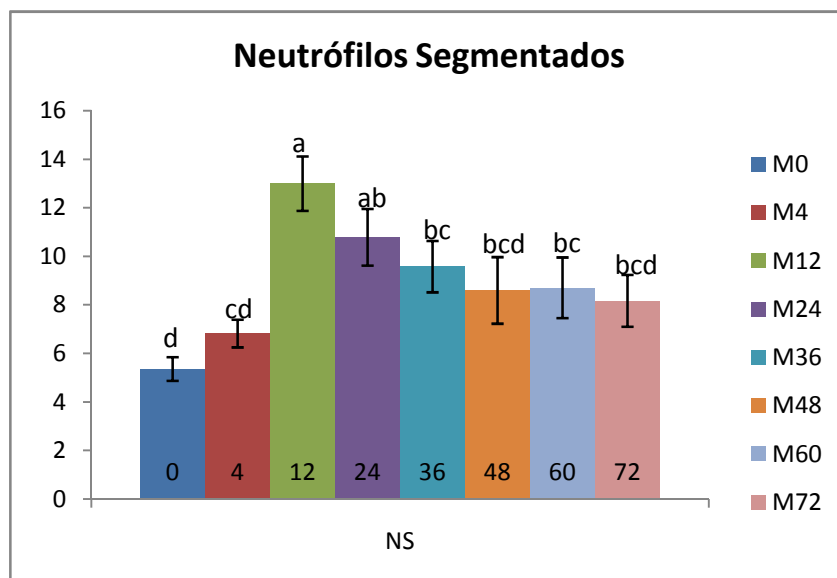


Figura 11. Média \pm erro padrão de neutrófilos segmentados (NS) $\times 10^3/\mu\text{L}$ de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

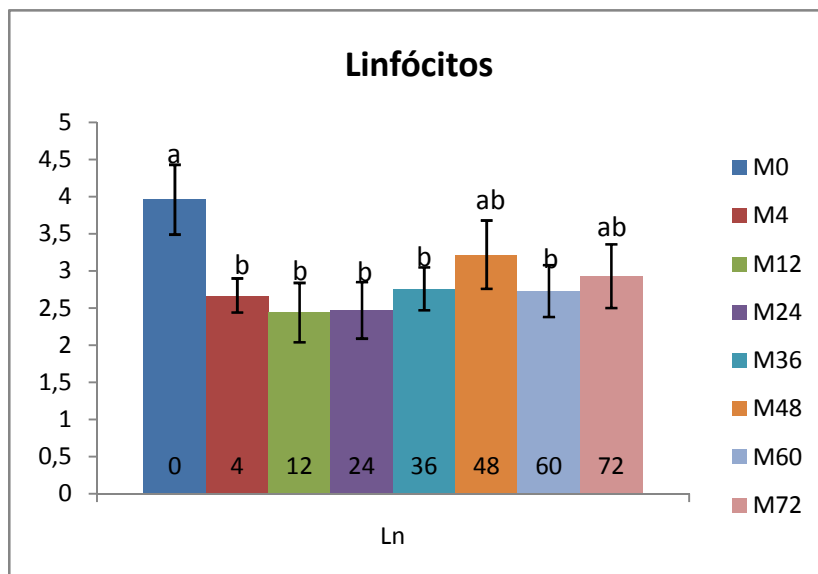


Figura 12. Média \pm erro padrão da média (EPM) de linfócitos (Ln) $\times 10^3/\mu\text{L}$ de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

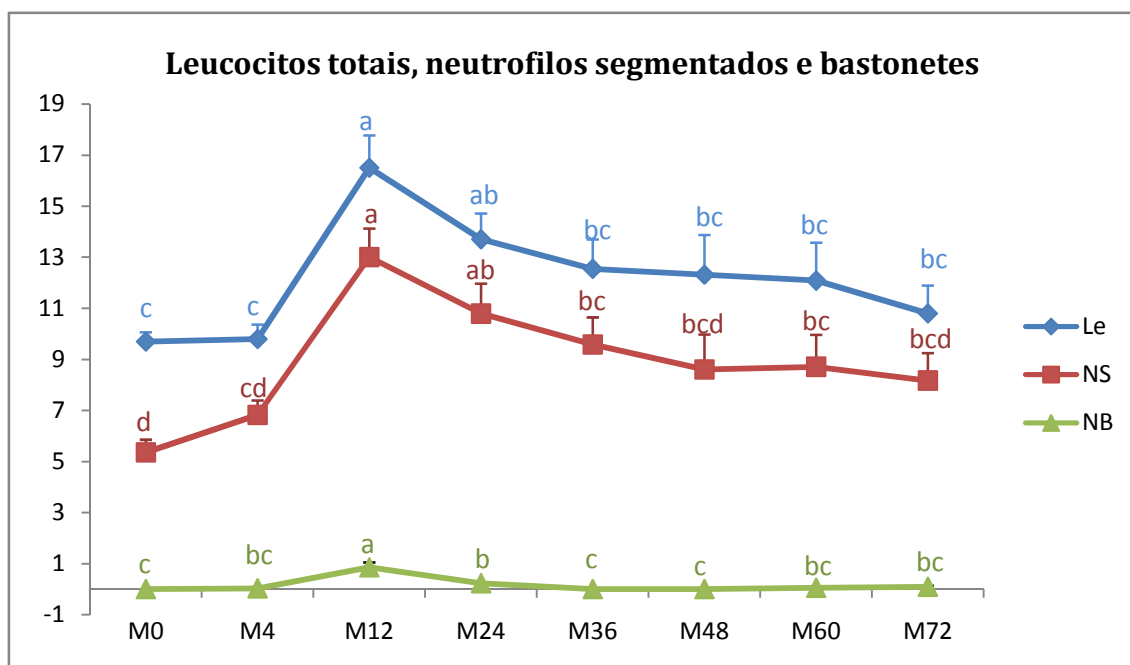


Figura 13. Média \pm erro padrão de leucócitos totais (Le) $\times 10^3/\mu\text{L}$, neutrófilos bastonetes (NB) $\times 10^3/\mu\text{L}$ e neutrófilos segmentados (NS) $\times 10^3/\mu\text{L}$, de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução 4 (M4), 12 (M12), 24 (M24), 36 (M36), 48 (M48), 60 (M60) e 72 (M72) horas após a desobstrução. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

4.3 Avaliação bioquímica do soro

Ao analisar as variáveis no soro, observou-se algumas alterações como o aumento de GSH ($p < 0,05$) em M24, M36 e M48, permanecendo nos demais momentos próximo ao valor basal. A Vit. E também apresentou aumento significativo ($p < 0,05$), porém em períodos diferentes (M48, M60 e M72), nos demais momentos houve leve aumento, mas este não foi significativo ($p < 0,05$). Já a Pt diminuiu ($p < 0,05$) em M4 e retornou aos valores próximos do basal em M12 e se manteve nos demais momentos. Tanto a MDA como a AOPP, apesar de demonstrarem leve aumento ao longo do tempo, este não foi significativo (Tabela 4, Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20)

Tabela 4. Médias \pm erro padrão da média (EPM) das variáveis MDA(nmol/gP), GSH(micromol/gP), AOPP($\mu\text{mol/L}$), Vit. E($\mu\text{mol/L}$) e Pt (g/mL), do soro de equinos submetidos à obstrução intraluminal do colón menor, antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Jaboticabal , 2015.

	M0	M4	M12	M24	M36	M48	M60	M72
MDA	62,08 \pm 7,30 ^a	75,47 \pm 5,04 ^a	64,25 \pm 6,67 ^a	74,32 \pm 8,49 ^a	81,48 \pm 10,65 ^a	83,57 \pm 7,03 ^a	80,28 \pm 10,70 ^a	67,36 \pm 10,32 ^a
AOPP	31,28 \pm 0,95 ^a	42,94 \pm 12,96 ^a	49,64 \pm 14,75 ^a	59,02 \pm 18,84 ^a	72,06 \pm 29,38 ^a	73,94 \pm 26,37 ^a	59,79 \pm 19,51 ^a	61,08 \pm 19,06 ^a
GSH	7,37 \pm 0,21 ^a	8,54 \pm 0,28 ^{ab}	8,39 \pm 0,41 ^{ab}	9,06 \pm 0,23 ^b	9,76 \pm 0,37 ^b	9,32 \pm 0,25 ^b	8,72 \pm 0,67 ^{ab}	8,47 \pm 0,34 ^{ab}
Vit E	8,68 \pm 1,47 ^b	8,26 \pm 1,36 ^b	11,30 \pm 1,84 ^{ab}	11,64 \pm 1,65 ^{ab}	12,93 \pm 2,84 ^{ab}	15,21 \pm 2,54 ^a	14,93 \pm 2,71 ^a	14,93 \pm 3,08 ^a
Pt	0,07 \pm 0,001 ^a	0,05 \pm 0,001 ^b	0,07 \pm 0,002 ^a	0,06 \pm 0,001 ^a	0,06 \pm 0,003 ^{ab}	0,06 \pm 0,002 ^a	0,07 \pm 0,003 ^a	0,07 \pm 0,003 ^a

MDA(malondealdeído), AOPP(prodoto protéico de ação avançada), GSH(Glutationa), Vit E (vitamina E), Pt (Proteína). Medias seguidas de letras desiguais na linha indicam diferença ($p < 0,05$)

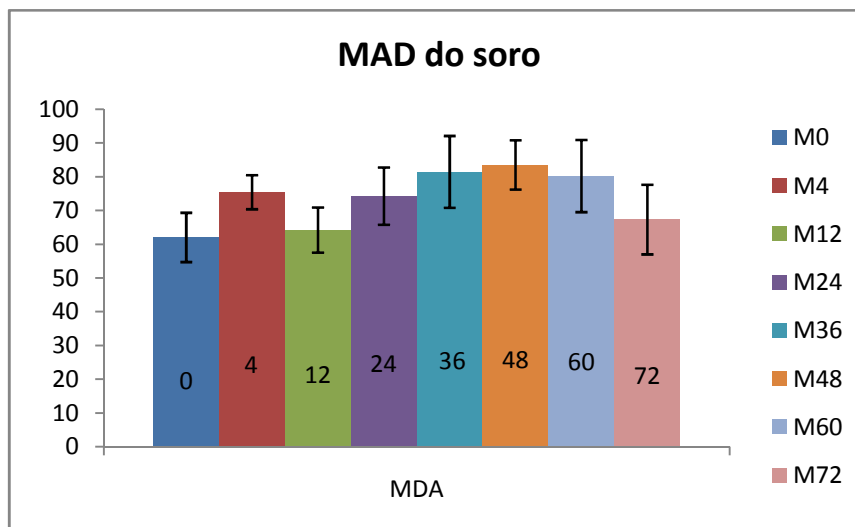


Figura 14. Média \pm erro padrão da média (EPM) de malondialdeído (MDA, em nmol/GP) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

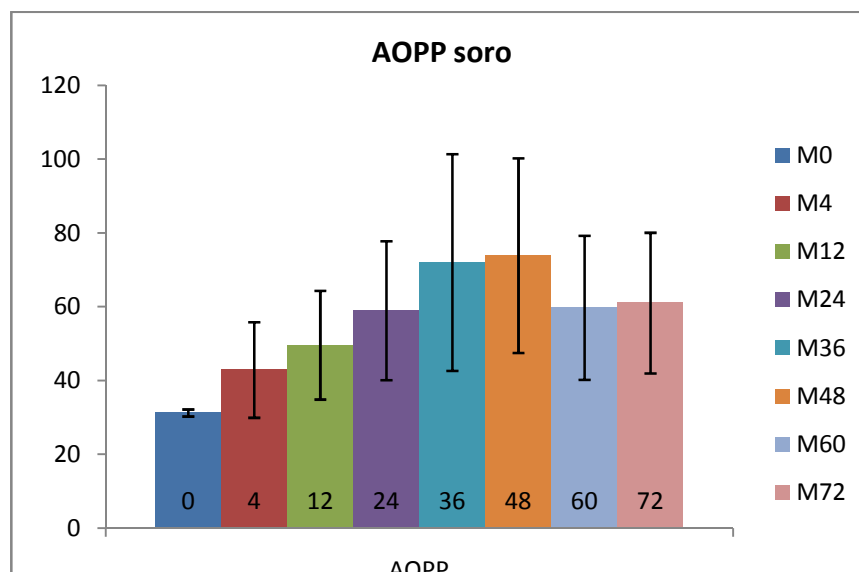


Figura 15. Média \pm erro padrão da média (EPM) de produto protéico de oxidação avançada (AOPP, em $\mu\text{mol/L}$) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

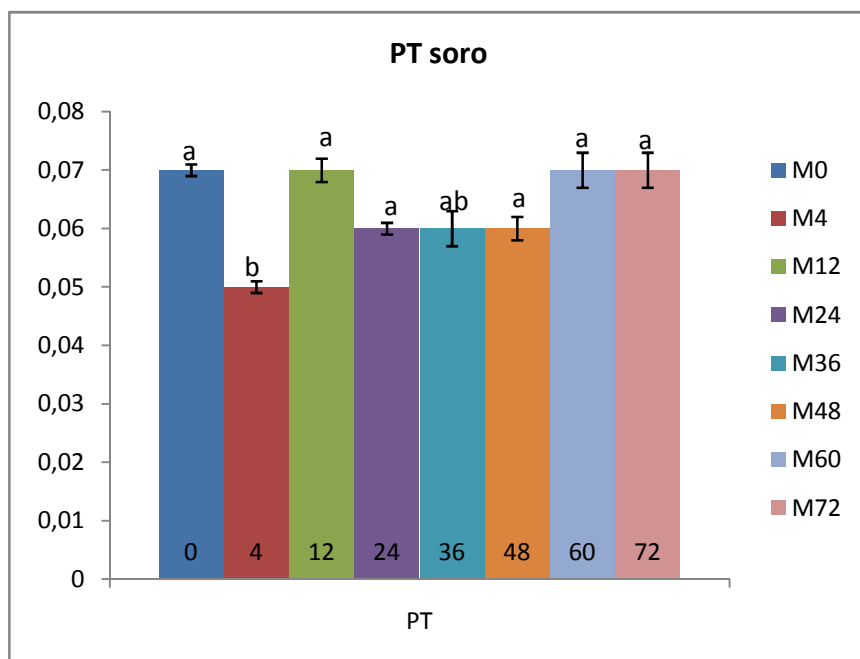


Figura 16. Média \pm erro padrão da média (EPM) de proteínas (PT, em g/mL) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

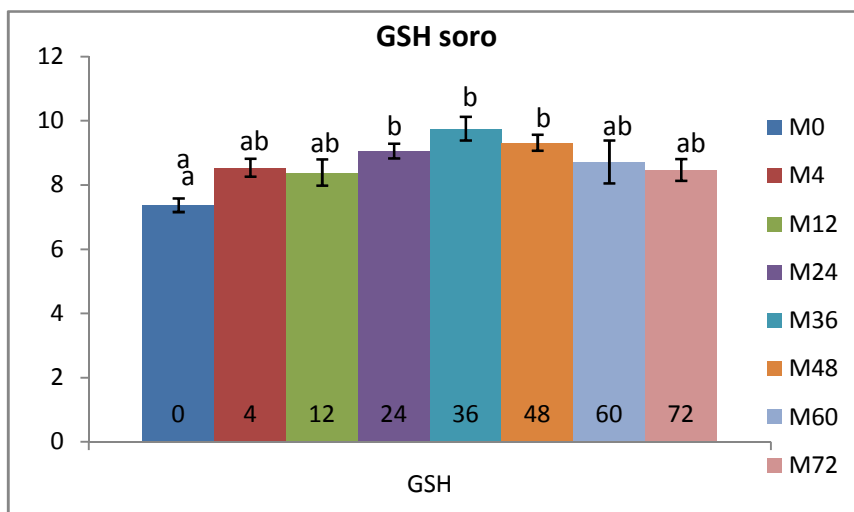


Figura 17. Média \pm erro padrão da média (EPM) de glutatona (GSH, em $\mu\text{mol/gP}$) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

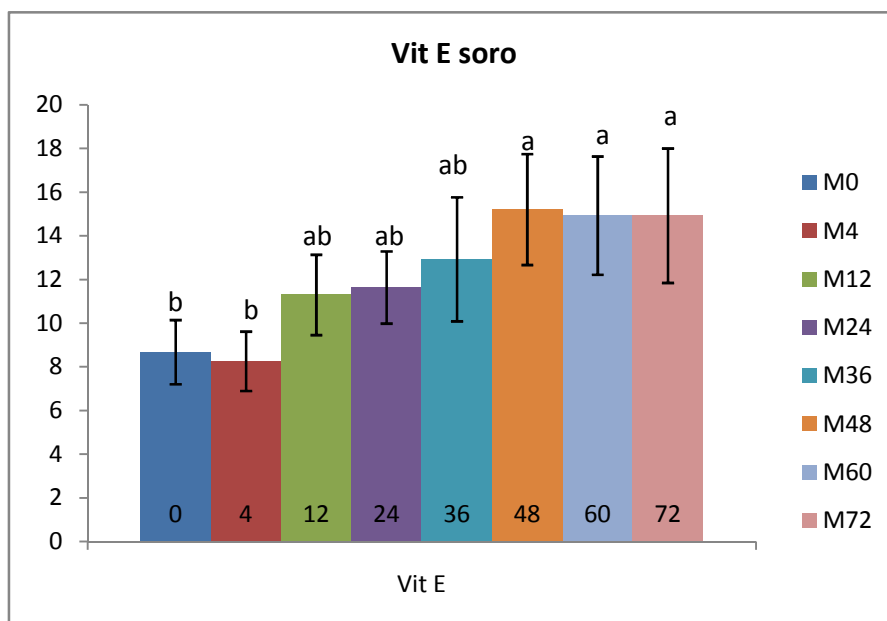


Figura 18. Média \pm erro padrão da média (EPM) de vitamina E (Vit E, em $\mu\text{mol/L}$) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução M4, M12, M24, M36, M48, M60 e M72. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

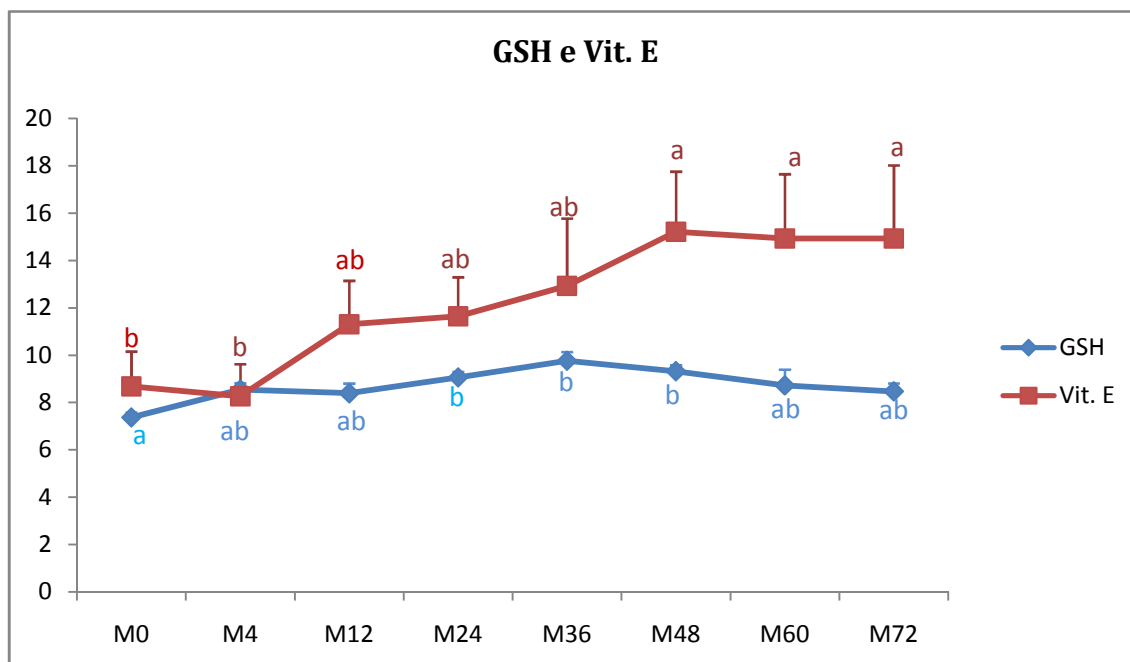


Figura 19. Média \pm erro padrão da média (EPM) de glutatona (GSH, em $\mu\text{mol/gP}$) e vitamina E (Vit. E, em $\mu\text{mol/L}$) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução 4 (M4), 12 (M12), 24 (M24), 36 (M36), 48 (M48), 60 (M60) e 72 (M72) horas após a desobstrução. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

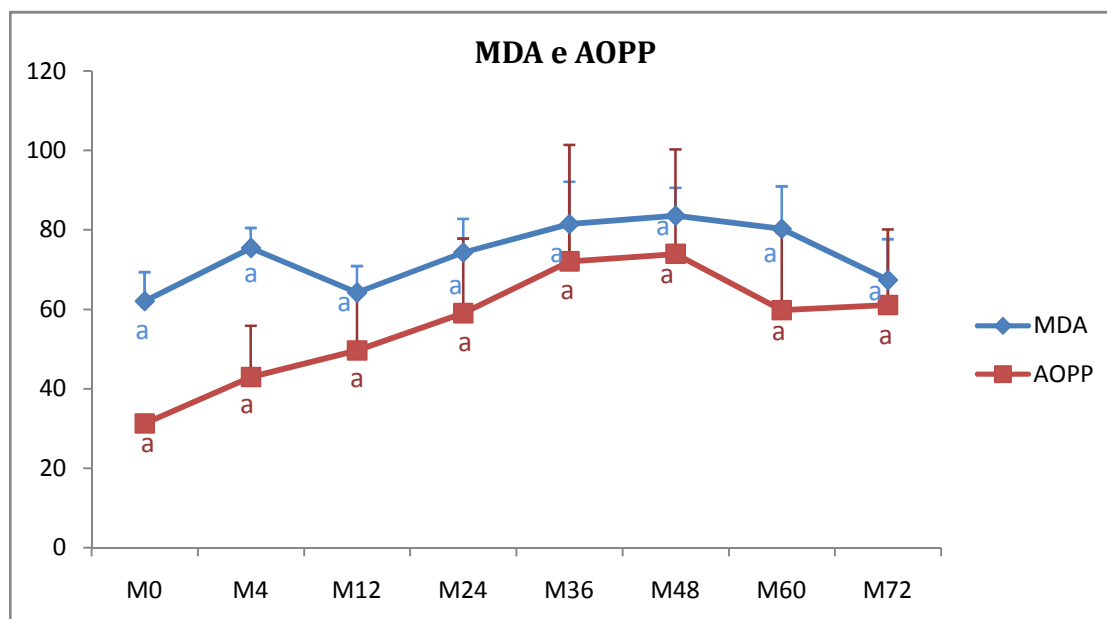


Figura 20. Média \pm erro padrão da média (EPM) de malondialdeído (MDA, em nmol/gP) e produto protéico de oxidação avançada (AOPP, em μ mol/L) de soro de equinos antes da indução anestésica (M0), após a desobstrução 4 (M4), 12 (M12), 24 (M24), 36 (M36), 48 (M48), 60 (M60) e 72 (M72) horas após a desobstrução. Médias seguidas de letras desiguais indicam diferença ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

4.4 Avaliação bioquímica do cólon menor

Nas análises bioquímicas de AOPP, MDA, GSH, catalase e PT de diferentes regiões teciduais do cólon menor (oral, balão e aboral), não foi observado nenhuma diferença estatística nos valores destas variáveis (Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9).

Tabela 5 Média \pm erro padrão da média (EPM) de AOPP (nmol/g tecido) de cólon menor de equinos no local da lesão, oral, balão e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal 2015.

AOPP	M0	M4	M72
ORAL	843,20 \pm 66,89	742,04 \pm 72,67	901,58 \pm 84,09
BALÃO	843,20 \pm 66,89	710,67 \pm 137,53	751,37 \pm 72,71
ABORAL	843,20 \pm 66,89	1024,04 \pm 151,56	912,35 \pm 96,08

AOPP (produto protéico de oxidação avançada). Médias seguidas de letras desiguais na linha indicam diferença ($p < 0,05$)

Tabela 6 Média \pm erro padrão da média (EPM) de MDA (nmol/g tecido) de cólon menor de equinos no local da lesão, oral, balão e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal 2015.

MDA	M0	M4	M72
ORAL	40,79 \pm 4,23	39,71 \pm 2,98	33,45 \pm 5,49
BALÃO	40,79 \pm 4,23	42,43 \pm 4,01	40,59 \pm 5,75
ABORAL	40,79 \pm 4,23	47,18 \pm 7,76	32,13 \pm 4,07

MDA (malondialdeído). Medias seguidas de letras desiguais na linha indicam diferença ($p < 0,05$)

Tabela 7 Média \pm erro padrão da média (EPM) de GSH (nmol/g tecido) de cólon menor de equinos no local da lesão, oral, balão e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal 2015

GSH	M0	M4	M72
ORAL	680,86 \pm 38,59	576,93 \pm 53,43	576,22 \pm 48,55
BALÃO	680,86 \pm 38,59	750,82 \pm 101,39	645,60 \pm 57,27
ABORAL	680,86 \pm 38,59	739,13 \pm 146,85	673,21 \pm 87,17

GSH(glutationa) .Medias seguidas de letras desiguais na linha indicam diferença ($p < 0,05$)

Tabela 8 Média \pm erro padrão da média (EPM) de catalase(U/mgPT) de cólon menor de equinos no local da lesão, oral, balão e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal 2015.

CATALASE	M0	M4	M72
ORAL	0,0016 \pm 0,0004	0,0020 \pm 0,001	0,0013 \pm 0,0006
BALÃO	0,0016 \pm 0,0004	0,0019 \pm 0,0011	0,0010 \pm 0,0006
ABORAL	0,0016 \pm 0,0004	0,0019 \pm 0,0012	0,0027 \pm 0,0021

Catalase. Medias seguidas de letras desiguais na linha indicam diferença ($p < 0,05$)

Tabela 9 Média \pm erro padrão da média (EPM) de PT(g/gT) de cólon menor de equinos no local da lesão, oral, balão e aboral, antes da colocação do balão (M0), após a desobstrução M4 e M72. Jaboticabal 2015.

PT	M0	M4	M72
ORAL	0,06 \pm 0,007	0,06 \pm 0,007	0,07 \pm 0,007
BALÃO	0,06 \pm 0,007	0,06 \pm 0,010	0,07 \pm 0,014
ABORAL	0,06 \pm 0,007	0,06 \pm 0,007	0,07 \pm 0,010

PT (proteína total).Medias seguidas de letras desiguais na linha indicam diferença ($p < 0,05$)

4.5 Avaliação macroscópica do cólon menor

Durante a escolha do local a ser obstruído e do procedimento de indução da obstrução, verificou-se a coloração e a integridade da serosa. Após quatro horas de distensão, a serosa da porção obstruída apresentava regiões cianóticas. Ao realizar a incisão para a retirada do balão, observou-se que a parede intestinal estava delgada e friável. Quarenta e cinco minutos após a

descompressão, a serosa desta região ainda se apresentava congesta e a parede intestinal espessada (Figura 21).

Nas regiões oral e aboral do cólon menor, os aspectos macroscópicos eram normais. Em todas as regiões foi observada a presença de pequenos coágulos aderidos à serosa e ao mesentério.



Figura 21. Imagem fotográfica do cólon menor da região balão/obstruída após quatro horas de obstrução, serosa apresentando regiões cianóticas.

4.6 Análise Microscópica do Cólon Menor

Foi realizada avaliação histológica das camadas intestinais e, em MO observou infiltração eosinofílica de mucosa, submucosa e serosa.

Em relação à camada mucosa, em M4 houve diferença entre as regiões oral, aboral e da obstrução. Na porção oral e aboral, o epitélio e a mucosa apresentavam-se íntegros, com presença de eosinófilos. Na porção aonde efetuou-se a obstrução, tanto a mucosa como o epitélio perderam sua integridade, mas mantiveram a infiltração eosinofílica (Figura 22).

Na submucosa, tanto na porção oral como aboral, se observou a presença de infiltrado inflamatório discreto, composto por macrófagos, plasmócitos e eosinófilos, distribuídos de maneira difusa. Porém, apenas na

porção oral, foi encontrado infiltrado moderado de linfócitos, com distribuição difusa, além de edema difuso e discreto. Na porção obstruída foi observado apenas infiltrado moderado de eosinófilos, com distribuição difusa.

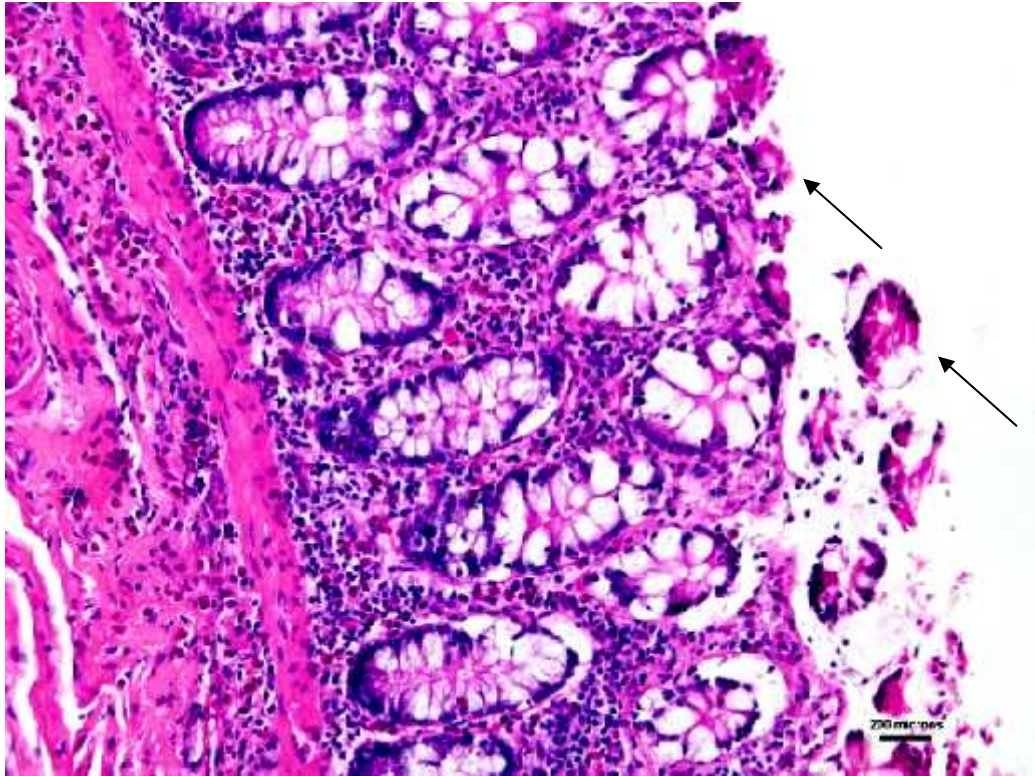


Figura 22. Fotomicrografia ilustrando a camada mucosa do cólon menor de equino submetido à obstrução intraluminal após quatro horas de indução (porção balão/obstruída). Observa-se a ausência do epitélio luminal e a destruição da mucosa (seta). Hematoxilina-Eosina, obj 20x

Na camada muscular e no tecido conjuntivo entre essas camadas da porção oral e aboral, foi observado infiltrado inflamatório discreto, composto de neutrófilos, distribuídos de maneira difusa. Na porção da obstrução, nenhuma alteração foi encontrada.

Já na camada serosa oral e aboral, ambas apresentaram infiltrado inflamatório moderado, composto de neutrófilos, distribuídos de maneira multifocal. Apenas na porção oral o infiltrado era composto por plasmócitos e macrófagos. Na porção onde o balão foi alocado, observou-se a presença de infiltrado inflamatório moderado, de distribuição multifocal, composto de neutrófilos (Figura 23).

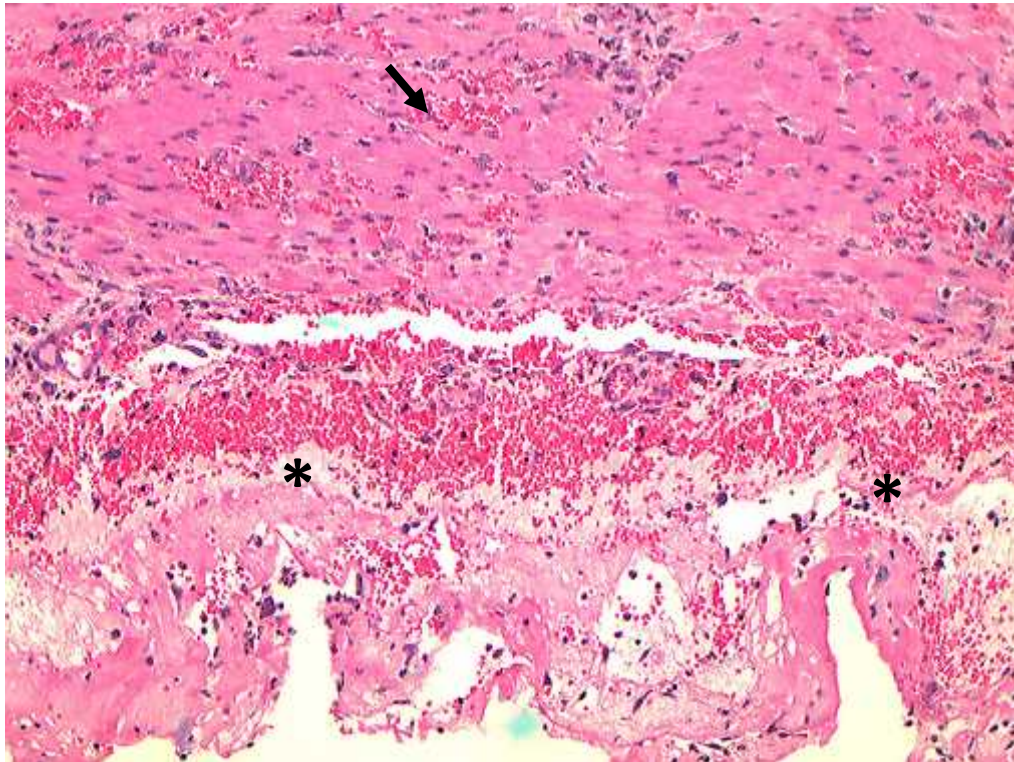


Figura 23. Fotomicrografia ilustrando as camadas muscular e serosa do cólon menor de equino submetido à obstrução intraluminal após quatro horas de indução (porção balão/obstruída). Observa-se hemorragia na camada muscular (setas) e hemorragia e edema na camada serosa (asteriscos). Hematoxilina-Eosina, obj 20x.

Em M72, as porções do cólon oral e aboral apresentaram o epitélio e a mucosa íntegros, com presença de eosinófilos. Na porção obstruída, 50% dos animais apresentaram a mucosa e o epitélio íntegros (Figura 24), porém nos outros animais foram observadas perda da integridade ou achatamento de mucosa, ou ainda, destruição de epitélio.

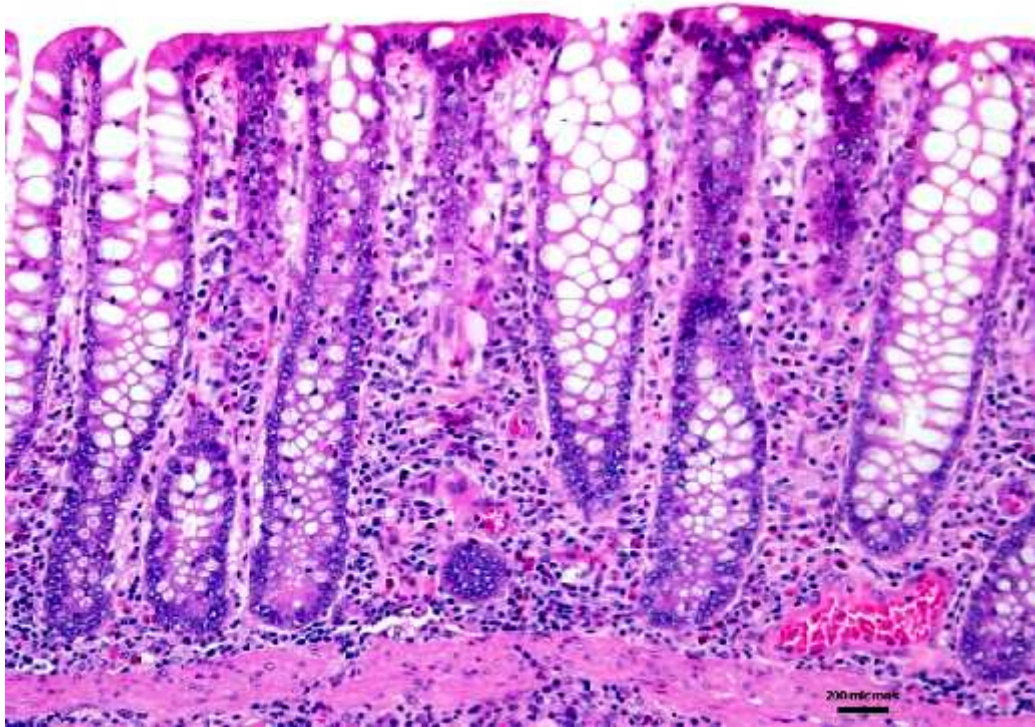


Figura 24. Fotomicrografia ilustrando a camadas mucosa do cólon menor de equino submetido à obstrução intraluminal após 72 horas de desobstrução (porção balão/obstruída). Observa-se o epitélio e a mucosa íntegros. Hematoxilina-Eosina, obj 20x.

Na submucosa, tanto oral como aboral, observou-se a presença de infiltrado inflamatório discreto, composto de macrófagos e eosinófilos, distribuídos de maneira difusa. Na porção obstruída, o infiltrado era composto por macrófagos, linfócitos e eosinófilos, também com distribuição difusa (Figura 25).

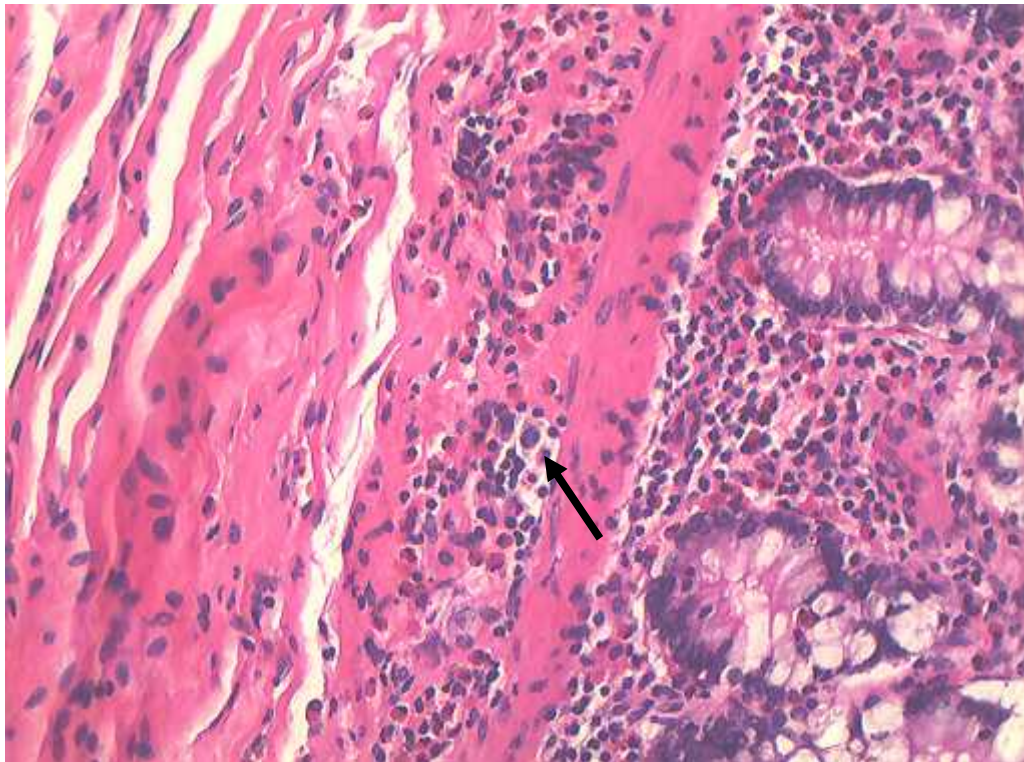


Figura 25. Fotomicrografia ilustrando a camada submucosa do cólon menor de equino submetido à obstrução intraluminal após 72 horas de desobstrução (porção balão/obstruída). Observa-se a presença de infiltrado inflamatório, com presença de macrófagos e linfócitos (seta). Hematoxilina-Eosina, obj 40x

Na camada muscular da porção oral e aboral foram observados infiltrados discreto de neutrófilos distribuídos de maneira multifocal, tanto na muscular como no tecido conjuntivo, entre as camadas musculares. Na porção da obstrução, observou-se a presença do infiltrado composto por neutrófilos, entre as fibras musculares.

Já na camada serosa oral e aboral, ambas apresentavam infiltrado inflamatório discreto, composto por neutrófilos e macrófagos distribuídos de maneira difusa. Na porção obstruída, observou-se a presença de infiltrado inflamatório discreto e distribuição multifocal, composto por neutrófilos e macrófagos, além de discretas áreas de hemorragia.

5. DISCUSSÃO

O procedimento experimental utilizado foi eficaz na obstrução intraluminal do cólon menor observando-se alterações pertinentes às observadas em casos naturais de cólica. A demais, observou-se alterações histológicas do cólon, assim como em parâmetros sanguíneos associados a resposta inflamatória sistêmica e resposta oxidativa.

A indução experimental de obstrução intraluminal de cólon descendente, em que foi empregada metodologia diferente da utilizada na presente pesquisa, em relação a pressão usada no balão, de 40 mmHg por 4 horas e utilização de drenos de Penrose na porção oral e aboral da obstrução com a finalidade de manter fixo o balão, observou-se aumento de frequência cardíaca após 12 horas, sendo o maior encontrado comparado aos outros momentos. Este mesmo fato foi observado em nosso trabalho (TEIXEIRA, 2011). Em trabalho realizado por Fagliari et al. (2008), com equinos com cólica submetidos a laparotomia, foram encontradas alterações nos quadros clínicos dos animais entre 24 e 48 horas após o ato cirúrgico, estes equinos já se encontravam diagnosticados com cólica cirúrgica e com uma média inicial maior dos parâmetros físicos se comparados com o presente estudo em que foi induzida a obstrução do cólon maior. No trabalho realizado por Lopes (2010) em que foi induzido quadro de cólica por meio de obstrução com dreno de Penrose, foram encontradas diferenças estatísticas (aumento) com relação a frequência cardíaca entre os momentos 5 e 6 horas ou entre 2 a 3 horas após a desobstrução. Com relação a frequência respiratória e temperatura não foram encontradas diferenças estatísticas. Esses resultados podem diferir do

presente trabalho pelo tempo cronológico menor, pela forma de obstrução e tratamento pós cirúrgico em que foi empregado o cloridrato de tramadol como agente analgésico. Neste mesmo trabalho realizado por Lopes (2010) foi encontrado diferença significativa em relação a motilidade dos animais, resultado este que se difere do presente trabalho em que não foram encontradas diferenças significativas.

Na avaliação hematologia é observado diminuição significativa da contagem de hemácias, da hemoglobina, do hematócrito e das plaquetas. Inicialmente (M4), este fato pode ser decorrente de hemodiluição associada a vasodilatação, pois neste momento os animais se encontravam sob anestesia inalatória e recebendo fluidoterapia (aproximadamente 5% do peso vivo). Segundo Mosley (2008) os anestésicos podem reduzir a contratilidade do miocárdio, diminuir o débito cardíaco e causar vasodilatação, essas alterações podem levar a redução na pressão arterial, aumento no volume intravascular decorrente da vasodilatação e, conseqüentemente, redução da perfusão tecidual. Na tentativa de minimizar os efeitos cardíacos e circulatórios causados pelos anestésicos é empregada a fluidoterapia, no entanto, do total de fluidoterapia com cristalóide isotônico administrado, 75% é redistribuído para o espaço intersticial e apenas cerca de 10% permanece no espaço intravascular após 3 horas da administração. Segundo Kerr (2003), nos estágios iniciais de hemorragia aguda a avaliação hematológica tem pouca utilidade, pois o que está sendo perdido é sangue total e a realização de hemograma neste momento não corresponde às alterações. No entanto, com o passar das horas a medida que o volume plasmático é restabelecido ocorre a queda no hematócrito, fato este que não ocorre ao longo do presente trabalho. Apesar de o procedimento ser considerado pouco cruento com relação a perda de sangue, não pode se descartar a sua importância com relação a essa queda na avaliação hematológica, concluindo que essa diminuição é decorrente desta somatória de fatores. Após o retorno anestésico os valores dessas variáveis hematológicas aumentam significativamente no momento M12, indicando hemoconcentração, podendo ser decorrente de desconforto abdominal, pois neste mesmo momento ocorre o aumento da frequência cardíaca. Em trabalho realizado por Costa et al. (2008), também foi observado aumento dos valores

do eritrograma, 18 horas após a retirada da obstrução sugerindo a hemoconcentração. Esse aumento pode ser em decorrência de contração esplênica desencadeada pelo estresse com a liberação de epinefrina e corticosteróides, pois o baço pode armazenar até 50% do total de células vermelhas (KERR, 2003; KOWAL et al., 2006). Já o valor do hematócrito obtido por Lopes (2010), não apresentaram diferença significativa, diferente do presente trabalho.

Em relação aos valores do leucograma resultados parecidos foram encontrados por Costa (2008), com aumento de neutrófilos segmentados ao longo do experimento e diminuição de linfócitos. No entanto, os valores encontrados para eosinófilos por este autor se elevaram inicialmente, porém após com posterior decréscimo, inversamente o que ocorreu no presente trabalho. Em trabalho realizado por Fagliari et al. (2008) também encontraram aumento de leucócitos com aumento de bastonetes, sendo que nos animais que sobreviveram ao ato cirúrgico a longo prazo, esta média dos valores decresciam. Já Di Filippo (2009) observou a ocorrência de aumento de monócitos após 72 horas, o que difere do presente trabalho, e diminuição de eosinófilos logo após desobstrução que corrobora com o achado no presente trabalho com a diferença de ter ocorrido em momento inicial (após desobstrução) se comparado a este trabalho. Segundo Di Filippo, (2009) esta eosinopenia pode ser decorrente da liberação de corticóides pelo estresse do procedimento. Segundo Kerr (2003), o estresse agudo leva a liberação de catecolaminas que provocam a diminuição de eosinófilos. Entre os causadores desse estresse estão incluídos pacientes estressados por dor intensa e pacientes sob anestesia. Portanto, a diminuição de eosinófilos encontrada neste trabalho pode ser decorrente da anestesia, pois no momento M4 em que o animal ainda se encontra sob anestesia é observada diminuição ($p < 0,05$) se comparada ao momento M0 e entre os momentos de M12 a M36 coincidem com os momentos em que foi observado aumento de frequência cardíaca e respiratória o que indica desconforto abdominal, outra provável causa dessa alteração.

No trabalho realizado por Ibrahim (2014), no qual foram estudados dois grupos, um contendo cavalos que foram atendidos e diagnosticados com

quadro de cólica (espasmódica, compactação e fermentação), realizando única coleta de amostra no momento inicial ao atendimento, e o segundo grupo composto por equinos hípidos sem sinais de desconforto abdominal (grupo controle). Com a finalidade de avaliar o nível de estresse oxidativo, foi observado aumento significativo de molécula oxidante (MDA) e a diminuição significativa de antioxidantes (GSH e catalase) indicando a ocorrência de estresse oxidativo. No presente trabalho foi observado o aumento das substâncias antioxidantes GSH e Vit. E. Essa diferença encontrada pode ser pelo fato dos cavalos que apresentaram quadro clínico de cólica no trabalho de Ibrahim (2014), se encontrarem com um tempo maior com relação a distensão das alças e por ter afetado uma maior extensão de segmentos (alças intestinais). O resultados do presente trabalho corrobora com a citação de White (2002), em que não ocorreu aumento significativo dos produtos oriundos da peroxidação de lipídeos durante a reperusão. Utilizando a definição de estresse oxidativo citada por Lykkesferldt (2007), que seria o desequilíbrio entre a quantidade de agentes oxidantes e os antioxidantes, podemos concluir que no presente trabalho as moléculas antioxidantes foram capazes de neutralizar a produção das moléculas oxidativas, apesar de apresentar diminuição inicial da vit. E em M4, o que indica o consumo e ao mesmo tempo observa-se um aumento dos agentes oxidantes (MDA e AOPP) estes não foram significativos se comparados ao basal.

Segundo Maurren e Moore (2004), o GSH é o antioxidante que funciona como primeira linha de defesa contra a oxidação e que a vit. E é o segundo antioxidante mais abundante, a funcionar como a segunda linha de defesa. Este fato foi observado em nosso trabalho pelo aumento inicial de GSH no momento M24 e o aumento posterior de vit E mais tardiamente (M48). Apesar da diferença significativa desses aumentos terem sido em momentos diferentes, corroborando com a teoria de uma primeira e segunda linha de defesa, notou-se que as duas moléculas antioxidantes não agem de forma totalmente separada, de fato esse descrito por Ferreira e Carochi (2013), em que relatam que apesar dos diferentes níveis de ação, que os antioxidantes acabam reagindo de forma sinérgica.

Em trabalho realizado por Ferro et al. (2010), em que foi realizada isquemia em cobaias com a utilização de microclampe em ramo da artéria mesentérica superior por período de 60 minutos seguida de reperfusão por 30 minutos, avaliando o antioxidante catalase no tecido do íleo tanto na região de isquemia como em região próxima não sob isquemia, apresentou aumento significativo deste antioxidante. Resultado este que se difere do presente trabalho em que não apresentou diferença significativa entre os valores dos tecido que sofreram isquemia (balão) e não isquemiados (porção oral e aboral). Esta diferença encontrada pode ter sido ocasionada pela diferença entre as metodologias, sendo que no trabalho de Ferro et al. (2010) ocorreu obstrução total dos vasos, já em nosso estudo acreditamos que a obstrução foi parcial, além do segmento intestinal ser diferente.

Em trabalho realizado por Marañón et al. (2009) em que foi encontrado diminuição significativa do GSH sendo esta maior na porção proximal em comparação a distal e aumento dos lipídeos peroxidados da mesma forma estes tendo valores maior na região proximal em comparação a distal. No entanto, esses resultados diferentes podem ser em decorrência da metodologia utilizada, em que se utilizaram cavalos diagnosticados com cólica na região de intestino delgado, em que foi necessária a realização de tratamento cirúrgico (entrectomia e enteroanastomose). Portanto o segmento já se apresentava desvitalizado e conseqüentemente com maior agravamento isquêmico. Já em nosso trabalho, apesar de a serosa do colón se apresentar macroscopicamente com coloração congesta, observou-se que 50% dos animais com 72 horas após obstrução já apresentavam o epitélio e a mucosa íntegros, demonstrando que não seria necessário a realização de entrectomia e enteroanastomose do colón menor.

No presente trabalho a avaliação do colón menor em relação a perfusão sanguínea foi realizada macroscopicamente. Já Faleiros et al. (2001), além da avaliação macroscópica, também realizaram ultrassonografia doppler. Estes autores realizaram obstrução dos vasos sanguíneos do colón menor através da utilização de drenos de Penrose em três regiões, oral com 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão, intermediária com 180 minutos de isquemia e 90 de reperfusão e aboral grupo controle sem obstrução sanguínea,

e constataram ausência circulatória no período de obstrução e logo após a desobstrução, confirmando a obstrução total dos vasos sanguíneos dos grupos em que foi realizada a obstrução. Com relação a análise macroscópica após 90 minutos de obstrução, foi observado congestão com hemorragias multifocais e coágulos de fibrina espalhados pela serosa. Após 180 minutos de obstrução o segmento já se apresentava com coloração azulada e com aspecto gelatinoso. Em ambas foi observado aumento de espessura da parede. Resultados parecidos foram observados no presente trabalho em comparação com o grupo em que foi realizada a obstrução por 90 minutos. Segundo Faleiros et al. (2001) foi encontrado moderada infiltração de eosinófilos na mucosa e submucosa em quase todas secções, resultado este também encontrado no presente trabalho. Em ambos os trabalhos foi encontrado infiltrado inflamatório composto por neutrófilos na camada serosa no momento da desobstrução e no ultimo momento, no entanto também verificamos em M72 a presença de macrófagos. Outro fato observado que difere do presente trabalho, foi a hemorragia presente na região da serosa encontrada em todos os momentos após obstrução, por Faleiros et al. (2001). Este fato foi observado somente em M72 no presente trabalho. O achado inflamatório neutrofílico e aumento de permeabilidade em região de serosa se justifica pelo fato de as moléculas de EROs, xantino oxidase e o fator de agregação plaquetária, realizarem a quimiotaxia desses neutrófilos e subsequente infiltração para o tecido. (MAURREN ; MOORE, 2004).

Em trabalho realizado por Teixeira (2011), no momento da desobstrução foi observado na região da mucosa infiltrado linfoplasmocitário e eosinofílico. Na submucosa foi observado edema e congestão vascular e o edema também estava presente na serosa. Estes resultados corroboram, pois as alterações de serosa e submucosa foram semelhantes. A ocorrência de edema da região submucosa também foi observado por Pagliosa et al. (2009), em que foi realizado obstrução com a utilização de dreno de Penrose sobre o jejuno de equinos por um período de 2 horas com o mesmo tempo de reperfusão. Segundo os autores esta foi causada pelo fato da obstrução ter sido parcial (obstrução venosa) em que a manutenção do fluxo arterial provoca um aumento da pressão hidrostática nas vênulas e extravasamento de liquido para

o interstício. Além do edema foi descrito a ocorrência de hemorragia na região da serosa logo após a desobstrução. Esses resultados também foram observados no presente trabalho, indicando que provavelmente promovemos vascular obstrução parcial. Segundo Blikslager (2009), a obstrução venosa e manutenção do fluxo arterial além de provocar o edema, também provoca lesão hemorrágica, concordando com nossos achados.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e na discussão é possível concluir que:

1. A obstrução intraluminal promovida pelo balão foi capaz de estimular respostas inflamatórias e oxidativas transitórias;
2. As alterações histológicas associadas à elevação de antioxidantes GSH e vitamina E indicam ocorrência de alteração no equilíbrio oxidativo e
3. A liberação de GSH e vitamina E modulou e impediu o desenvolvimento de estresse oxidativo.

7. REFERENCIAS

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23 n. 4 p. 629-643, 2010.

BARREIRO, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: reação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 113-123, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n.2, p. 123-130, 1999.

BLIKSLAGE, A. T. Pathophysiology of gastrointestinal disease: obstruction and strangulation. In: WHITE, N. A.; MOORE, J. N.; MAIR, T. S. **The equine acute abdomen**, TentonNewMedia. 2009, p. 99-111.

COSTA, N. S.; RIBEIRO, G.; DÓRIA, R. G. S.; CANOLA, P. A.; SILVA, P. C.; JORGE, R. L. N.; FAGLIARI, J.J. Hemograma e hemogasometria de equinos submetidos à obstrução experimental de jejuno, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1367-1374, 2008.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

CORRÊA, R. R.; ZOPPA, A. L.; SILVA, L. C. C.; FERNADES, W. R.; BACCARIN, R. Y. A.; CRUZ, R. S. F.; FANTONI, D. T. Estudo retrospectivo dos casos de enterolitíase e corpo estranho em intestino grosso de eqüinos, no período de janeiro de 1993 a janeiro de 2003. **Brazilian Journal Of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 242-249, 2006.

DAVID, J. M.; BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

DIAS, D. C. R. Estresse oxidativo na fisiopatogenia de enfermidades de equinos. **Brazilian Journal of Equine Medices**, n. 1, v. 40, p 11-25, 2012.

DI FILIPPO, P. A. **Obstrução intestinal experimental em equinos: parâmetros clínicos e laboratoriais**. 2009. 96f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

FABIANEK, J.; DEFILIPPI, J.; RICKARDS, T.; HERP, A. Micromethod for tocopherol determination in blood serum. **Clinical Chemistry**, v.14, n.5, 1968.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L.; SILVA, P. C.; PEREIRA, G. T. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos à laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 322-328, 2008.

FALEIROS, R. R.; ALVES, G. E. S.; SANTOS, R. L.; MARQUES JUNIOR, A. P.; MACORIS, D. G. Experimental ischemia and reperfusion in equine small colon. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53 n. 3 p. 1-12, 2001.

FALEIROS, R. R.; MACORIS, D. G.; ALVES, G. E.; SAQUETTI, C. H. C.; ALESSI, A. C. Avaliação histomorfométrica e ultra-estrutural da mucosa do cólon menor equino submetido a distensão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 9, p. 383-387, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, n. 43, v 1, p. 61-68, 1997.

FERRO, C. O.; CHAGAS V. L. A.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L.; SCHANAIDER, A. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, n. 37, V.1, p. 031-038, 2010.

FLAHERTY, J.; WEISFELDT, M. L. Reperfusion Injury. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 5, p. 409-419, 1988.

GÉRARD-MONNIER, D.; ERDELMEIER, I.; RÉGNARD, K.; MOZE-HENRY, N.; YADAN, J.C.; CHAUDIÈRE, J. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 1176-1183, 1998.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.

IBRAHIM, H. M. M. Oxidative stress associated with spasmodic, flatulent, and impaction colic in draft horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 1205-1210, 2014.

Jl, L. L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proceeding of the Society for Experimental Biology And Medicine**, v. 222, p. 283-292, 1999.

JORDÃO-JUNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. **Revista da Faculdade de Medicina De Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP Universidade de São Paulo**, v 31, n.3, p. 434-449, 1998.

LOPES, M. S. C. **Efeitos do tramadol no modelo de dor induzida por obstrução intestinal em equinos**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

KERR, M. G. Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematológica. **Roca** , São Paulo, 2 ed, 2003

KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horse. **The Veterinary Journal**. v. 177 p. 178-191, 2008.

KOWAL, R.J.; ALMOSNY, N.R.P.; CASCARDO, B.; SUMMA, R. P.; CURY, L.J. Avaliação dos valores hematológicos em cavalos (*Equus caballus*) da raça Puro-Sangue-Inglês (PSI) submetidos a teste de esforço em esteira ergométrica. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**,v. 13, n. 1, p.25-31, 2006.

LYKKESFERLDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 502-511, 2007

MACHADO, P. L.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V. F.; YONEZAWA, L.A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidante de interesse na medicina veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MARAÑÓN, G. et al. Alterations in the glutathione metabolism could be implicated in the ischemia-induced small intestinal cell damage in horses. **BMC Veterinary Research**, v. 5, p. 1-10, 2009.

MATOS, J. J. R. T.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R.; MARQUES JUNIOR, A. P. Lesões de isquemia e reperfusão no intestino de equinos: fisiopatologia e terapêutica. **Ciência Rural**, Santa Maria , v. 30, n. 6, p. 1083-1093, 2000.

MAURREN, M.; MOORE, R. M. Isquemia-reperfusion injury pathophysiology, part I. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v .14, p.231-241, 2004.

MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; GRANGER, D. N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic

interventions: a review and its implications in the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 3, p. 115-132, 1995.

MOSLEY, C. Equilíbrio hidroeletrolítico e ácido base. In: DOBERTY, T.; VALVERD, A. **Manual de Anestesia e Analgesia em Equinos**. Editora Roca, São Paulo, 2008, p.81-98.

PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R. MATOS, J. R. T.; TORRES, M. B.; MENDES, H. M. F.; COSTA, R. S. Utilização da glutamina no tratamento de lesões de isquemia e reperfusão no jejuno em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 246-252, 2009.

PRICHARD, M.; DUCHARME, N. G.; WILKINS, P. A.; ERB, H. N.; BUTT, M. Xanthine oxidase formation during experimental ischemia of the equine small intestine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 310-314, 1991.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C.C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, ed. 9, p.176-190, 2002.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, p. 219-236, 2007.

RUF, W.; SUEHIRO, G. T.; SUEHIRO, A.; PRESSLER, V.; MCNAMARA, J.J. Intestinal blood flow at various intraluminal pressure in the piglet close abdomen. **Annals of Surgery**, v. 191, p. 157-163, 1980.

ROWE, E. L.; WHITE, N. A. Reperfusion injury in the equine intestine. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 1, p. 148-162, 2002.

TEIXEIRA, L. G. **Processo de reparo no cólon descendente equino submetido ou não a distensão luminal: aspectos clínicos , bioquímicos e anatomopatológicos**. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

TRAUB-DARGATZ, J. L.; KOPRAL, C. A.; SEITZINGER, A. H.; GARBER, L. P.; FORDE, K.; WHITE, N. A. Estimate of the national incidence of and operation-level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to spring 1999. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 219, n. 1, p. 67-71, 2001.

WITKO-SARSAT, V.; FREDLANDER, M.; CHAPEILLÈRE-BLANDIN, C.; NGUYEN-KHOA, T.; NGUYEN, A. T.; ZINGRAFF, J. JUNGERS, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney international**, v. 49, p. 1304-1313, 1996.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, 1994.