

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

**RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS SISTÊMICA, DO CASCO E  
DO CÓLON MENOR SUBMETIDO À DISTENSÃO EM  
EQUINOS**

**Kamila Gravena  
Médica Veterinária**

**2014**

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

**RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS SISTÊMICA, DO CASCO E  
DO CÓLON MENOR SUBMETIDO À DISTENSÃO EM  
EQUINOS**

**Kamila Gravena**

**Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Regina Peiró**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

**2014**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

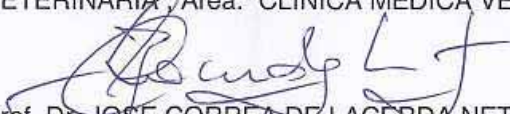
**TÍTULO:** RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS SISTÊMICA, DO CASCO E DO CÓLON MENOR SUBMETIDO À DISTENSÃO EM EQUINOS

**AUTORA:** KAMILA GRAVENA

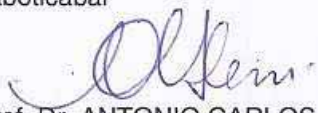
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOSE CORREA DE LACERDA NETO

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRO


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR 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

  
Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. PAULO ALESCIO CANOLA

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

  
Prof. Dr. RAFAEL RESENDE FALEIROS

Universidade Federal de Minas Gerais / Belo Horizonte/MG

  
Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES

Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Data da realização: 17 de março de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

KAMILA GRAVENA – nascida na cidade de Londrina - PR, em 01 de Julho de 1984, Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), no ano de 2007. Em Agosto de 2008 ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária e obteve o Título de Mestre em Julho de 2010 com a dissertação intitulada: "Avaliação da Integridade dos Tecidos Dérmico e Epidérmico do Casco de Equinos Colhidos pelo Acesso Trans-Mural Dorsal". Em Agosto deste mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Clínica Veterinária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

"Everybody wants happiness

nobody wants pain

but you can't have a rainbow

without a little rain"

Autor desconhecido

Dedico este trabalho a meu pai, minha mãe e minha irmã, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, a quem devo tudo que sou, pelo amor, incentivo e confiança.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Correa de Lacerda Neto (Prof. Juca), não apenas pela orientação, mas também pela amizade, dedicação, paciência, apoio, ensinamentos, confiança, atenção, e também, pelo amor e dedicação aos cavalos.

À Profa. Dra. Juliana Regina Peiró, minha co-orientadora, pela amizade, apoio, contribuição científica, conselhos e confiança.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP – Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade, por me acolher e se tornar a minha segunda casa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão de bolsa de doutorado e financiamento integral a esta pesquisa.

À amiga Lina Maria Wehrle Gomide, pelo apoio durante todo este experimento, tanto na parte profissional, como na parte pessoal. Pela amizade formada durante estes quatro anos, que nos levou até a Índia, e que eu espero, continue nos levando para novas viagens.

Ao amigo Carlos Eduardo Campi, que aceitou minhas viagens com a Lina, mesmo não trazendo o kimono tão esperado. E por ter me aturado durante todos esses anos.

Ao amigo Evandro Zacché, pela amizade e ensinamentos. Por ter me mostrado e me ensinado a gostar da cardiologia. Por ter confiado em mim e me apoiado a diminuir os estudos com a "unha" do cavalo e a começar os estudos com a cardiologia equina.

Às amigas Amanda e Mariana, minhas eternas ICs. Pelo companheirismo, amizade e disposição em todos os momentos.

Aos amigos Nara, André, Vinícius, Álvaro, Cristina, Deborah e Daniela, pela grande colaboração prestada no decorrer deste experimento.

Ao Prof. Dr. Paulo Alécio Canola, o qual ainda não acostumei chamar de professor, por ter me ajudado muito nos exames radiográficos e nos procedimentos anestésicos deste experimento.

À Profa. Dra. Renata Gebara Sampaio Dória, por ter me ensinado e me apoiado a realizar a técnica cirúrgica deste experimento.

Ao Prof. Júlio Carlos Canola, pela disponibilidade, boa vontade, ensinamentos, contribuindo com sua opinião e experiência;

Ao Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho, pelos ensinamentos, oportunidades e contribuição científica.

Aos componentes da banca examinadora da qualificação e da defesa, Prof. Dra. Mirela Tinucci Costa, Prof. Dra. Flavia Lombardi Lopes, Prof. Dra Lina Maria Wehrle Gomide, Prof. Dr Gustavo Garkalms de Souza Oliveira; Prof. Dr. Rafael Resende Faleiros, Prof. Dr. Luiz Claudio Nogueira Mendes, Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi e Prof. Dr. Paulo Alécio Canola pelas sugestões e contribuição para o melhoramento do trabalho.

Aos estagiários que participaram no decorrer deste experimento, em especial à Gabriela Bregadioli e ao Felipe Crialesi.

À amiga Samira Paleari Cerrato, pelos momentos divertidos e de descontração.

Ao funcionário Odair Oian (Deco) pela convivência e colaboração neste experimento.

À minha família, que me suportou ... em todos os sentidos ...

À Luma (Lhú), minha fiel e amada labrador, grande companheira, que me diverte, me distrai, e que junto vamos crescendo e aprendendo cada dia mais.

Ao Quick-Field, meu Puro Sangue Inglês, que conviveu comigo, me ensinou muito e me trouxe muitas alegrias.

A todos os cavalos que participaram desse experimento.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho...

**MEU SINCERO AGRADECIMENTO!!!**

## SUMÁRIO

|                                                         |             |
|---------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                      | <b>iii</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                            | <b>iv</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                            | <b>viii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                               | <b>1</b>    |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                    | <b>2</b>    |
| 2.1 Síndrome Cólica.....                                | 2           |
| 2.2 Injúria de isquemia e reperfusão.....               | 4           |
| 2.3 Inflamação.....                                     | 7           |
| 2.4 Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica.....    | 10          |
| 2.5 Endotoxemia.....                                    | 15          |
| 2.6 Laminite.....                                       | 17          |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                | <b>21</b>   |
| 3.1 Gerais.....                                         | 21          |
| 3.2 Específicos.....                                    | 21          |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                       | <b>22</b>   |
| 4.1 Animais.....                                        | 22          |
| 4.2 Exames Físicos.....                                 | 22          |
| 4.3 Preparo dos animais.....                            | 23          |
| 4.4 Procedimento Anestésico.....                        | 24          |
| 4.5 Procedimento Cirúrgico.....                         | 24          |
| 4.6 Biópsia do cólon menor.....                         | 26          |
| 4.7 Biópsia do casco.....                               | 27          |
| 4.8 Colheita e processamento do sangue venoso.....      | 28          |
| 4.9 Colheita e processamento do líquido peritoneal..... | 28          |
| 4.10 Cuidados pós-cirúrgicos.....                       | 29          |

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.11 Eutanásia e Necropsia .....                                             | 30        |
| 4.12 Procedimentos laboratoriais .....                                       | 30        |
| 4.12.1 Avaliação eritroleucométrica e citológica do líquido peritoneal ..... | 30        |
| 4.12.2 ELISA sanduíche.....                                                  | 31        |
| 4.12.3 qRT-PCR em Tempo Real.....                                            | 31        |
| <b>4.12.3.1 Extração de RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)</b> .....   | 32        |
| <b>4.12.3.2 PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)</b> .....               | 33        |
| <b>4.12.3.3 Normalização dos dados</b> .....                                 | 33        |
| 4.12.4 Procedimentos histológicos .....                                      | 34        |
| 4.13 Análises estatísticas e apresentação dos resultados .....               | 34        |
| <b>5. Resultados .....</b>                                                   | <b>35</b> |
| 5.1 Parâmetros Clínicos.....                                                 | 35        |
| 5.2 Avaliação Hematológica .....                                             | 36        |
| 5.3 Avaliação do Líquido Peritoneal.....                                     | 39        |
| 5.4 ELISA sanduíche.....                                                     | 42        |
| 5.5 qRT-PCR em tempo real .....                                              | 42        |
| 5.6 Avaliação macroscópica do cólon menor.....                               | 49        |
| 5.7 Análise Histológica .....                                                | 49        |
| 5.7.1 Cólon menor.....                                                       | 49        |
| 5.7.2 Casco .....                                                            | 54        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                                                    | <b>58</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES .....</b>                                                   | <b>68</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS.....</b>                                                   | <b>69</b> |

**RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS SISTÊMICA, DO CASCO E DO CÓLON MENOR  
SUBMETIDO À DISTENSÃO EM EQUINOS**

**RESUMO** - A relação entre a ocorrência de cólica e a manifestação da laminite tem sido estudada por inúmeros pesquisadores. Alguns trabalhos com indução experimental de laminite demonstram a participação da resposta inflamatória na origem da afecção. Devido a isso, buscou-se entender a resposta inflamatória de equinos tanto em nível sistêmico, como local, no intestino e no tecido dérmico/epidérmico podal, assim como determinar possíveis alterações clínicas e laboratoriais após obstrução intraluminal do cólon menor. Para isso, foram utilizados oito equinos adultos, hípidos, com idade entre oito e 14 anos. Estes foram submetidos a celiotomia associada a dilatação intraluminal do cólon menor, simulando o abdômen agudo por enterólito. Biópsias de casco e cólon menor foram efetuadas neste momento e, também, foram colhidas amostras de sangue e líquido peritoneal. Após quatro horas de obstrução intraluminal, o balão foi desinflado e realizou-se novas biópsias de casco e cólon menor e colheu-se novamente amostras de sangue e líquido peritoneal. Durante o pós-cirúrgico, os animais foram monitorados por meio de exames físicos em intervalos de 12 horas. Após 72 horas da desobstrução foram efetuadas as últimas coletas de casco, cólon, sangue e líquido peritoneal. As amostras de sangue e líquido peritoneal foram utilizadas para avaliação hematológica e para a determinação da expressão gênica das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  por meio da PCR em tempo real e para quantificar as IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  por ELISA sanduiche. Os tecidos obtidos nas biópsias foram processados para avaliação histológica e determinação das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  pela técnica da PCR em tempo real. Os valores obtidos nas avaliações hematológicas diferiram ( $p < 0,05$ ) dos valores basais, principalmente após quatro horas de obstrução (M4) e após 12 horas de pós-cirúrgico (M12). As citocinas avaliadas por ELISA (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), aumentaram em M4 e retornaram aos valores basais em M72 no líquido peritoneal, mantendo-se inalteradas nas amostras séricas. Quanto a expressão gênica, no sangue, não houve diferença significativa. No líquido peritoneal, todas diferiram dos valores basais. Quanto ao cólon, o TNF- $\alpha$  diferiu nos segmentos oral e aboral. Já no casco, apenas TNF- $\alpha$  foi significativo, aumentando em M72. No histopatológico do casco e do cólon, foram observadas alterações. No cólon, estas alterações foram mais evidenciadas no segmento onde o balão ficou localizado durante a obstrução. As alterações encontradas nas lâminas dérmicas e epidérmicas do casco foram as descritas como alterações iniciais de laminite, porém não houve evolução durante o período experimental.

**Palavras-chave:** obstrução intraluminal, cavalo, citocinas, inflamação

## **SYSTEMIC, HOOF AND SMALL COLON INFLAMMATORY RESPONSES IN EQUINE SUBMITTED TO SMALL COLON DISTENSION**

**ABSTRACT** - Numerous researchers have studied the relationship between colic and laminitis manifestation. Some studies with experimentally induced laminitis demonstrated involvement of the inflammatory response in the development of the disease. Therefore, the aim of this study was to investigate systemic and local inflammatory response, in intestines and hoof dermal and epidermal tissues, as well as to determine clinical and laboratory changes after intraluminal obstruction in small colon. For this purpose, eight healthy adult horses were submitted to a celiotomy to induce intraluminal distension of the small colon simulating acute abdomen by enterolith. Hoof and small colon biopsies were made at this time, and samples of blood and peritoneal fluid were collected. After four hours of intraluminal obstruction, the ball was deflated and new biopsies of hoof and small colon collected and blood and peritoneal fluid sampled. During the postoperative, animals were monitored by physical examinations every 12 hours. After 72 hours of ball removal, the last biopsies of hoof, colon, blood and peritoneal fluid were collected. The samples of blood and peritoneal fluid were used for hematological evaluation, for determining gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  by real-time PCR and to quantify IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  by sandwich ELISA. Tissues obtained from biopsies were processed for histological evaluation and determination of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  by real time PCR. The values obtained in hematological evaluation differ ( $p < 0.05$ ) from baseline, especially four hours after obstruction (M4) and after 12 hours of postoperative (M12). Cytokines concentrations in peritoneal fluid increased in M4, returned to baseline within M72 and remained unchanged in serum samples. Regarding gene expression in blood, there was no significant difference. In peritoneal fluid, all cytokines differed from baseline. Concerning the colon, the TNF- $\alpha$  differed in oral and aboral segments. In the hoof, only TNF- $\alpha$  was significant, increasing in M72. Histopathological changes were observed in hoof and colon. These changes were more evident in the segment where the balloon was located during obstruction. The changes found in the hoof dermal and epidermal laminae were described as early changes of laminitis, but no clinical signs were observed during the experimental period.

**Keywords:** intraluminal obstruction, horse, cytokines, inflammation

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Ilustração esquemática das etapas da migração de neutrófilos ao longo dos vasos sanguíneos (KUMAR et al.,

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                   | 2010).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 10 |
| <b>Figura 2.</b>  | Inter-relação entre sepse, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e a infecção. Observa-se que a bacteremia pode ou não desenvolver sepse (DAVIES; HAGEN, 1997)....                                                                                                                                                                                                                                                        | 12 |
| <b>Figura 3.</b>  | Ilustração esquemática da patogenia da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) e da Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória (CARS) (SHERWOOD; TRABER, 2012).....                                                                                                                                                                                                                                               | 13 |
| <b>Figura 4.</b>  | Ilustração esquemática da cascata de sinalização intracelular induzida por lipopolissacarídeos. Linhas com barras são moléculas inibidoras e setas são ativações ou consequências (ANNANE; BELLISANT; CAVAILLON, 2005).                                                                                                                                                                                                                | 17 |
| <b>Figura 5.</b>  | Ilustração esquemática mostrando a histologia laminar normal e os três graus de desenvolvimento histopatológico da laminite (POLLITT, 2004).....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 20 |
| <b>Figura 6.</b>  | Imagem fotográfica do procedimento de celiotomia para obstrução do cólon menor em equino. (A) escolha do segmento a ser manipulado, com observação dos ramos das artérias mesentéricas (seta). (B) Bola de látex, estéril, pronta para o procedimento a ser desenvolvido. (C) Introdução da bola de látex no lúmen do colón menor. (D) Bola posicionado e inflado no cólon menor.....                                                  | 25 |
| <b>Figura 7.</b>  | Diagrama demonstrando o esquema do procedimento experimental da obstrução intraluminal do cólon menor de equinos. As setas indicam os momentos de coletas das amostras teciduais.....                                                                                                                                                                                                                                                  | 26 |
| <b>Figura 8.</b>  | Imagem fotográfica do procedimento de biópsia do casco de equino submetido à obstrução do cólon menor. (A) Corte das lâminas epidérmicas e dérmicas podais com lâmina de bisturi número 11. (B) Descolamento da lâmina dérmica da falange distal com o auxílio do esculpador Frahm.....                                                                                                                                                | 27 |
| <b>Figura 9.</b>  | Imagem fotográfica do procedimento de colheita de líquido peritoneal em equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. (A) Seringa de 20 mL acoplada após a inserção da cânula mamária na cavidade abdominal com o animal em estação. (B) Obtenção do líquido peritoneal em M0. (C) Acoplamento da seringa de 20 mL na sonda uretral n° 14 com o equino em decúbito dorsal. (D) Obtenção do líquido peritoneal em M4..... | 29 |
| <b>Figura 10.</b> | Valores de frequência cardíaca (FR) em batimentos por minuto, frequência respiratória (FR) em movimentos por minuto e temperatura retal (T <sub>R</sub> ) em graus Celsius, obtidos dos animais submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor, considerando M0 antes do procedimento anestésico                                                                                                                                   |    |

- e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós cirúrgico. Letras iguais na linha não diferem entre si ( $p>0,05$ )..... 36
- Figura 11.** Valores de contagem de hemácias (He) ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobina (Hg) (g/dL), hematócrito (Ht) (%) e plaquetas (Plaq) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós cirúrgico. Letras iguais na linha não diferem entre si ( $p>0,05$ )..... 38
- Figura 12.** Valores da contagem de leucócitos totais (Le) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), eosinófilos (Eos) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos bastonetes (NB) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos segmentados (NS) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), linfócitos (Ln) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e monócitos (Mo) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós cirúrgico. Letras iguais na linha não diferem entre si ( $p>0,05$ )..... 39
- Figura 13.** Avaliação do líquido peritoneal de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. (A) Valores da contagem de hemácias (He) ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobina (Hg) (g/dL), hematócrito (Ht) (%) e plaquetas (Plaq) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). (B) Valores da contagem de leucócitos totais (Le) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), polimorfonucleados (Poli) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e mononucleados (Mono) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M12, M24, M48 e M72 como pós cirúrgico. Letras iguais na linha não diferem entre si ( $p>0,05$ )..... 41
- Figura 14.** Comparação das citocinas entre os diferentes métodos de análises. (A) Valores obtidos no ELISA para as IL-1 $\beta$  e IL-6 e para o TNF- $\alpha$  no sangue. (B) Valores de IL 1 $\beta$ , 6, 8, 10 e TNF- $\alpha$  obtidos com PCR em tempo real no sangue. Todas as amostras obtidas de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico. Letras iguais dentro do mesmo gene não diferem entre si ( $p>0,05$ )..... 44
- Figura 15.** Comparação das citocinas entre os diferentes métodos de análises. (A) Valores obtidos no ELISA para IL-1 $\beta$  e IL-6 e para o TNF- $\alpha$  no líquido peritoneal. (B) Valores de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  obtidos com PCR em tempo real no líquido peritoneal. Todas as amostras obtidas de equinos

- submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico. Letras iguais dentro do mesmo gene não diferem entre si ( $p>0,05$ )..... 45
- Figura 16.** Comparação das citocinas entre as diferentes regiões do cólon menor obtidas de equinos submetidos a obstrução intraluminal. (A) Valores de IL 1 $\beta$ , 6, 8, 10 e TNF $\alpha$  da região oral à obstrução. (B) Valores da região em que a bola de látex permaneceu durante a obstrução. (C) Valores da região aboral à obstrução. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico. Letras iguais dentro do mesmo gene não diferem entre si ( $p>0,05$ )... 47
- Figura 17.** Valores de IL 1 $\beta$ , 6, 8, 10 e TNF $\alpha$  do tecido dérmico e epidérmico do casco de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico. Letras iguais dentro do mesmo gene não diferem entre si ( $p>0,05$ )..... 48
- Figura 18.** Fotomicrografia ilustrando a camada mucosa do cólon menor de equino submetido à obstrução intraluminal após 4 horas de indução (porção obstruída). Observa-se a ausência do epitélio e a destruição da mucosa (seta). Hematoxilina-Eosina, obj 20x..... 50
- Figura 19.** Fotomicrografia ilustrando as camadas muscular e serosa do cólon menor de equino submetido à obstrução intraluminal após 4 horas de indução (porção obstruída). Observa-se hemorragia na camada muscular (setas) e hemorragia e edema na camada serosa (asteriscos). Hematoxilina-Eosina, obj 20x..... 51
- Figura 20.** Fotomicrografia ilustrando as camadas mucosa e submucosa do cólon menor de equino submetido à obstrução intraluminal após 72 horas de desobstrução (porção obstruída). Observa-se o epitélio e a mucosa íntegros. Hematoxilina-Eosina, obj 20x..... 52
- Figura 21.** Fotomicrografia ilustrando a camada submucosa do cólon 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 linfócitos (seta). Hematoxilina-Eosina, obj 40x.. 53

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 22.</b> | Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco antes da obstrução intestinal do cólon menor, na qual se observa a integridade da amostra e a disposição das lâminas epidérmicas primárias (LEP) e lâminas dérmicas primárias (LDP). Hematoxilina-Eosina, obj 10x.....                                                                                        | 54 |
| <b>Figura 23.</b> | Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas secundárias (LDS) do casco antes da obstrução intestinal do cólon menor, visualizando-se a membrana basal contornando nitidamente as lâmina epidérmicas secundárias (LES) (setas). Ácido Periódico-Schiff, obj 100x.....                                                                                               | 55 |
| <b>Figura 24.</b> | Fotomicrografia ilustrando grande quantidade de queratinócitos entre a membrana basal e a porção queratinizada da da lâmina epidérmica primária (LEP) e a presença de núcleos picnóticos (setas) presentes nas lâminas epidérmicas secundárias (LES) de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor após 72 horas de desobstrução. Hematoxilina-Eosina, obj 40x..... | 56 |
| <b>Figura 25.</b> | Fotomicrografia ilustrando o alongamento das lâminas epidérmicas secundárias (LES) e a perda do posicionamento anatômico dos núcleos (setas) do casco de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor após 72 horas de desobstrução. Hematoxilina-Eosina, obj 40x.....                                                                                                | 56 |
| <b>Figura 26.</b> | Fotomicrografia ilustrando o adelgaçamento da membrana basal (setas) do casco de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor após 72 horas de desobstrução. Ácido Periódico-Schiff, obj 100x.....                                                                                                                                                                    | 57 |
| <b>Figura 27.</b> | Fotomicrografia ilustrando o afilamento da membrana basal (seta) do casco de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor após 72 horas de desobstrução. Ácido Periódico-Schiff, obj 100x.....                                                                                                                                                                        | 57 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das variáveis clínicas de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós cirúrgico.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 35 |
| <b>Tabela 2.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) da contagem de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%) e plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós cirúrgico.....                                                                                                                                                                                                      | 36 |
| <b>Tabela 3.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) da contagem de leucócitos totais ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), eosinófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos bastonetes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos segmentados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós cirúrgico.....                                | 37 |
| <b>Tabela 4.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) da contagem de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), leucócitos totais ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), polimorfonucleados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e mononucleados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no líquido peritoneal de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M12, M24, M48 e M72 como pós cirúrgico..... | 40 |
| <b>Tabela 5.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das Interleucinas 1 $\beta$ , 6 e TNF- $\alpha$ no sangue de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico.....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 42 |
| <b>Tabela 6.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das Interleucinas 1 $\beta$ , 6 e TNF- $\alpha$ no líquido peritoneal de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 42 |
| <b>Tabela 7.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das Interleucinas -1 $\beta$ , -6, -8, -10 e TNF- $\alpha$ em leucócitos do sangue periférico de                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                   | equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico.....                                                                                                                                                 | 43 |
| <b>Tabela 8.</b>  | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das Interleucinas -1 $\beta$ , -6, -8, -10 e TNF- $\alpha$ de leucócitos do líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico.....       | 43 |
| <b>Tabela 9.</b>  | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ da região oral à obstrução intraluminal do cólon menor de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico.....                                             | 46 |
| <b>Tabela 10.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ da região obstruída do cólon menor de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico.....                                                                 | 46 |
| <b>Tabela 11.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ da região aboral à obstrução intraluminal do cólon menor de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico.....                                           | 46 |
| <b>Tabela 12.</b> | Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ do tecido dérmico e epidérmico podal de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da reperfusão sanguínea após desobstrução intestinal e M72 como pós cirúrgico..... | 48 |

## 1. INTRODUÇÃO

A busca pelas causas da laminite, uma doença aparentemente multifatorial, tem instigado inúmeros grupos de pesquisa, dadas as diferentes modalidades de estudo que o tema propicia. O estabelecimento de relação entre a ocorrência da síndrome cólica e a manifestação de laminite tem sido o objetivo de inúmeros trabalhos científicos. Durante muitos anos, acreditou-se que esta conexão fosse estabelecida pelas endotoxinas. Porém, embora as administrações experimentais de endotoxinas fossem capazes de produzir dores abdominais e morte dos animais associadas a alterações fisiológicas características de cólica, não promoviam o desenvolvimento de laminite, independentemente da dose administrada.

Mais recentemente, demonstrou-se que algumas alterações associadas à laminite poderiam ocorrer devido a disfunções metabólicas. Paralelamente, trabalhos experimentais de indução de laminite destacaram a participação de processos inflamatórios na gênese da afecção, indicando que os polimorfonucleares podem estar no epicentro destas manifestações. Trabalhos experimentais envolvendo tanto os distúrbios gastrintestinais como as alterações podais tem destacado a importância do processo inflamatório no desenvolvimento das alterações hemodinâmicas, celulares, bioquímicas e teciduais. Diante do exposto, buscou-se por bem, avaliar possíveis relações existentes entre a obstrução intestinal e o tecido laminar podal de equinos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Síndrome Cólica

A etiologia das doenças do trato gastrintestinal de equinos que causam abdômen agudo é complexa e diversa. Dentre as causas conhecidas estão as parasitoses, a sobrecarga alimentar, as mudanças na dieta, a ingestão de areia, enterólitos e alguns agentes infecciosos (WHITE, 1990).

As cólicas são, em geral, classificadas com base nas alterações morfofuncionais e nas lesões dos diferentes segmentos do trato gastrintestinal (MENDES; PEIRÓ, 2004). Estas classificações são: obstrução simples, obstrução estrangulativa, infartos não estrangulativos, infecções intestinais ou enterites (WHITE, 1990). Dentre os inúmeros tipos de cólica, as obstruções intestinais têm sido apontadas como causa principal de internação e óbitos em equinos em hospitais veterinários de todo o mundo (FALEIROS et al., 2007). Estudo retrospectivo sobre abdômen agudo realizado no Brasil destacou que obstruções por enterólitos ou corpo estranho no intestino grosso representavam 19% das ocorrências, dos quais mais da metade (51,35%) foram causadas por obstrução do cólon menor (CORRÊA et al., 2006). Estes dados não diferem dos relatados por outros autores para o estado da Califórnia no hemisfério norte, nas quais as enterolitíases representaram 15,1%, sendo que as obstruções do cólon menor atingem 45,1% dos casos (HASSEL et al., 1999).

Qualquer condição que interfira com o movimento aboral da ingesta no trato gastrintestinal tem o potencial para induzir a distensão intestinal e causar dor severa. As obstruções simples são causadas pela oclusão do lúmen intestinal, sem ocorrência de comprometimento vascular primário, desenvolvendo-se tanto por obstrução intraluminal, intramural, ou por compressão externa (ALLEN; TYLER, 1990).

As obstruções do cólon menor são normalmente causadas por uma simples massa endurecida chamada de fecaloma ou fitobezoar, ou por enterólitos (WHITE, 1990). Estas obstruções vem sendo relatadas na literatura há mais de 140 anos. Porém, apenas recentemente houve aumento na identificação desses casos

(HASSEL, 2002). Os enterólitos ou cálculos intestinais são concreções de estruvita (fosfato de amônia e magnésio) (HASSEL, 2002; CORRÊA et al., 2006) formados por camadas concêntricas depositadas continuamente ao redor de um núcleo, que é, em geral, um corpo estranho (CORRÊA et al., 2006).

Apesar de haver várias causas para a formação desses cálculos, a patogênese permanece desconhecida (CORRÊA et al., 2006). Sabe-se que equídeos que recebem grande quantidade de farelo de trigo apresentam maior predisposição à afecção, pois este possui grande concentração de proteínas, fósforo e magnésio (MCDUFFEE; SCHIFFMAN; PARROT, 1994). Também foi relatado o desenvolvimento de enterólitos em equinos alimentados com alfafa (HASSEL; SCHIFFMAN; SNYDER, 2001) uma vez que a concentração de magnésio neste alimento é seis vezes maior que a necessidade diária para a espécie e, também, devido ao seu elevado teor proteico, o qual aumenta a carga de nitrogênio derivado da amônia no intestino (SNYDER; SPIER, 1996). A amônia que ultrapassa a capacidade de conversão em aminoácidos pelas bactérias intestinais permanece livre, podendo se ligar com íons fosfato e magnésio e formar a estruvita (BLUE, 1979).

Ao se impactarem com a parede intestinal, os enterólitos, inicialmente, estimulam contrações espasmódicas em torno do cálculo, resultando em obstrução aguda e íleo adinâmico. A oclusão do lúmen intestinal impede o movimento da ingesta, dos fluidos, e do gás resultando no aumento da osmolaridade do conteúdo intestinal, causando o influxo de água dos vasos presentes na mucosa para o interior do lúmen. Com isso a distensão aumenta, e o aumento decorrente da pressão, interfere na drenagem venosa, promovendo congestão e edemaciação da mucosa. Esta distensão da parede pode chegar a causar isquemia à medida que a obstrução se prolonga e se agrava (ALLEN; TYLER, 1990).

Os sinais clínicos demonstrados pelos animais dependem do formato dos enterólitos e da sua localização. Os cálculos maiores e mais regulares são conhecidos por causarem obstrução nas porções mais delgadas do intestino grosso, como flexura pélvica, cólon transverso e cólon menor, sendo estas duas últimas localizações os principais pontos de obstrução (CORRÊA et al., 2006). O início dos sinais de desconforto abdominal são leves e intermitentes, e podem se manter por

vários dias, até que a obstrução intraluminal se torne completa, quando então os sinais dolorosos passam a ter intensidade moderada à severa e manifestação contínua (RAKESTRAW; HARDY, 2012). A pressão contra a parede leva a hiperemia e congestão da porção acometida, culminando em isquemia seguida de necrose do segmento. Caso a obstrução se prolongue, pode ocorrer a perfuração da parede intestinal, levando a peritonite fatal (BLUE, 1979).

As características do líquido peritoneal se alteram com a evolução do quadro e servem como indicadores da gravidade da lesão do trato gastrointestinal. Em estágios iniciais, a produção do líquido e a migração de leucócitos são mínimas, podendo ser de difícil obtenção (BLUE, 1979). A piora do quadro pode promover diapedese de eritrócitos e de leucócitos, tornando o líquido peritoneal de coloração âmbar a avermelhado (BLUE; WITTKOPP, 1981). A concentração de proteínas no líquido peritoneal também é um indicador da viabilidade da parede intestinal. Concentrações acima de 4,2 g/dL, indicam prognóstico desfavorável (MOORE, 1990).

O único tratamento de sucesso é a retirada cirúrgica do enterólito, o qual deve ser feita o mais precocemente possível. A precocidade na realização do procedimento cirúrgico está associada a ocorrência de menores alterações inflamatórias e hemodinâmicas e, conseqüentemente, ao melhor prognóstico. A sobrevivência independe do local do acesso cirúrgico (linha alba ou flanco) e esta escolha depende da condição clínica do paciente e da sua capacidade de suportar a manipulação intra-abdominal (BLUE, 1979).

## **2.2 Injúria de isquemia e reperfusão**

A principal causa de morte em equinos está associada a ocorrência de abdômen agudo, no qual os fatores causais estão frequentemente agregados às afecções seguidas de isquemia e reperfusão (MATOS et al., 2000). As causas primárias associadas à isquemia compreendem os enfartos não estrangulatórios. Nos equinos, o principal causador é o trombo-embolismo das artérias mesentéricas, associado à infestação por *Strongylus vulgaris* (WHITE, 1990) e as obstruções por estrangulamento, como os vólvulos, intussuscepções, torções e hérnias

estranguladas, as quais correspondem 46% dos casos de cólica (DUCHARME et al., 1983).

Inicialmente, considerava-se que o tratamento das afecções intestinais isquêmicas visando o restabelecimento circulatório era possível simplesmente por meio da correção cirúrgica. Porém, observou-se posteriormente que algumas alças intestinais, que no momento do procedimento cirúrgico estavam viáveis, evoluíam para necrose (MATOS et al., 2000). Com o avanço no conhecimento da fisiopatologia das lesões isquêmicas, observou-se que a reperfusão tecidual, embora essencial na preservação da célula impedindo que esta morra por anóxia, também agrava lesões pré-existentes. Quadro este denominado de lesão de reperfusão (ROWE; WHITE, 2002; KUMAR et al., 2010).

A isquemia é definida como redução ou interrupção total do fluxo sanguíneo, sendo considerada uma das principais causas de lesão tecidual (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; METZE, 1998). Estas alterações desencadeadas pela isquemia consistem na redução ou bloqueio da oferta de oxigênio, impedindo o metabolismo energético aeróbio e, também, diminuindo o suprimento de nutrientes, comprometendo assim a geração de energia anaeróbica, decorrente do esgotamento dos substratos glicolíticos ou pela inibição da glicólise devido ao acúmulo de ácido láctico que, normalmente seriam removidos pelo fluxo sanguíneo (ROWE; WHITE, 2002; KUMAR et al., 2010). Quando a tensão de oxigênio diminui dentro da célula, reduz a geração de Adenosina Trifosfato (ATP). Esta diminuição das concentrações de ATP resulta em distúrbios de homeostase celular. Com a redução da energia, ocorre falha na bomba de sódio, alterando a permeabilidade da membrana celular, permitindo o aporte de sódio, cálcio (MATOS et al., 2000; ROWE; WHITE, 2002) e água para dentro da célula e perda de potássio, levando à expansão citoplasmática e tumefação celular (PEREIRA, 1998; MATOS et al., 2000; ROWE; WHITE, 2002; KUMAR et al., 2010).

O acúmulo de cálcio no interior da célula produz aumento expressivo na atividade da protease e da fosfolipase  $A_2$ . As proteases agem degradando a membrana celular, a cromatina e o citoesqueleto. Já a fosfolipase  $A_2$  lesa diretamente a membrana celular por meio do aumento na produção de ácido araquidônico, fator de agregação plaquetária e lisofosfatidilcolina. O fator de

agregação plaquetária é um mediador inflamatório potente, o qual exerce importante efeito na permeabilidade vascular e nos neutrófilos (quimiotaxia, agregação intravascular, degranulação e produção de radical superóxido) (MATOS et al., 2000). Se o fluxo sanguíneo for restaurado, imediatamente antes da falência da membrana e das organelas, todas essas alterações são reversíveis (ROWE; WHITE, 2002). Porém, se a isquemia persistir, ocorrem lesões irreversíveis levando a morte celular principalmente por necrose (KUMAR et al., 2010).

O retorno do fluxo sanguíneo pode restaurar as células. No entanto, quando este fluxo é reparado, pode exacerbar a lesão. Os fatores que atuam neste agravamento da lesão tecidual são vários. Uma das causas é a produção aumentada de radicais livres derivados do oxigênio no tecido pós-isquêmicos (McCORD, 1985). Os radicais livres derivados do oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas que possuem um elétron não pareado em seu orbital externo (ROWE; WHITE, 2002; KUMAR et al., 2010). Devido a esse elétron, eles se tornam altamente reativos com moléculas adjacentes, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, podendo produzir alterações celulares graves (KUMAR et al., 2010).

Estas ROS são normalmente produzidas durante a respiração e produção energética mitocondrial, sendo removidas pelo sistema de defesa celular (PEREIRA, 1998; KUMAR et al., 2010), os quais incluem antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, e moléculas não enzimáticas, como o alfa tocoferol, o ácido ascórbico e o beta caroteno (ROWE; WHITE, 2002). O equilíbrio entre a eliminação e a produção das ROS é de fundamental importância para a manutenção da integridade tecidual. Quando há desequilíbrio, as ROS desencadeiam o processo chamado de estresse oxidativo, produzindo alterações teciduais por meio da peroxidação de lipídios presentes no citoplasma e na membrana celular, oxidação de proteínas e fragmentação de ácidos nucleicos (PEREIRA, 1998; KUMAR et al., 2010). No caso de lesões de isquemia e reperfusão, acredita-se que este aumento da ROS está associado ao acúmulo de hipoxantina e da conversão de xantina desidrogenase em xantina oxidase durante a isquemia. Com o restabelecimento do oxigênio para os tecidos, a xantina oxidase aumenta a velocidade da reação de hipoxantina em ácido úrico formando  $O_2^-$  e  $H_2O_2$

desencadeando assim o estresse oxidativo (MATOS et al., 2000; ROWE; WHITE, 2002).

O óxido nítrico (NO), mediador químico importante produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios cerebrais, também pode atuar no processo de isquemia e reperfusão (GRANGER; KORTHUIS, 1995; KUMAR et al., 2010). Sua principal função consiste na regulação do fluxo sanguíneo mediante relaxamento da musculatura lisa vascular, promovendo a vasodilatação. O NO também reduz a agregação e adesão plaquetária, reduz a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular e inibe a formação de microtrombos (MATOS et al., 2000; KUMAR et al., 2010), atuando, aparentemente, como protetor em episódios de inflamação aguda (WONG; BILLIAR, 1995). Durante os quadros inflamatórios, a síntese de NO é aumentada, passando a exercer efeitos indesejáveis, como por exemplo, interferindo na regulação da circulação local e sistêmica ou na produção de moléculas altamente reativas como os radicais hidroxil e dióxido de nitrogênio e o ânion peroxinitrito altamente reativo (ONOO<sup>-</sup>) (KUMAR et al., 2010; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Em equídeos as lesões de reperfusão já foram descritas em trabalhos experimentais (MESCHTER; CRAIG; HACKET, 1991; HORNE et al., 1994; MOORE et al., 1994; FALEIROS, 2003). Estas lesões de isquemia e reperfusão também foram associadas a diferentes complicações pós-cirúrgicas, entre as quais se destacam a endotoxemia e a laminite (MOORE et al., 1995).

### **2.3 Inflamação**

O mecanismo de defesa inata do organismo se baseia em três elementos, as barreiras externas, as respostas inespecíficas e as antígeno-específicas. A inflamação é considerada a resposta inespecífica inicial do organismo contra a lesão tecidual (DAVIES; HAGEN, 1997), e apresenta cinco sinais cardinais: rubor (eritema), tumor (edema), calor (aquecimento), dor e perda da função (KUMAR, et al., 2010).

A resposta inflamatória é uma reação complexa, que consiste principalmente nas respostas dos vasos sanguíneos e dos leucócitos. A presença de proteínas e leucócitos no sangue, permite o recrutamento rápido para os locais extravasculares lesados. Na inflamação aguda há três etapas principais: a alteração no calibre

vascular, aumentando o fluxo sanguíneo; a mudança estrutural da microvasculatura, permitindo a saída de proteínas plasmáticas e de leucócitos da circulação; e a migração de células brancas, com posterior acúmulo no foco da injúria para eliminar o agente agressor (KUMAR, et al., 2010).

Estas mudanças no fluxo e no calibre vascular se iniciam logo após a lesão. A vasodilatação é uma das manifestações iniciais, induzida pela ação de vários mediadores, dentre eles a histamina e o óxido nítrico (NO), no músculo liso vascular. O resultado deste fluxo sanguíneo aumentado é calor e eritema no local da inflamação. A vasodilatação é rapidamente seguida pela permeabilidade aumentada da microvasculatura, causando o movimento de proteínas e células para fora do sistema vascular, conhecido como exsudação. Vários mecanismos são responsáveis pela permeabilidade vascular aumentada, na qual a contração das células endoteliais é o mais comum, resultando no aumento dos espaços interendoteliais. Esta contração, de curta duração, é estimulada por mediadores químicos tais como a histamina, bradicinina e leucotrienos (KUMAR, et al., 2010).

Outro mecanismo é a injúria endotelial, resultando em necrose e desprendimento das células endoteliais (ACKERMANN, 2009), o qual pode manter o extravasamento por várias horas até que o dano direto ao endotélio seja reparado (KUMAR, et al., 2010). Neste mecanismo, os neutrófilos que aderem ao endotélio também podem causar danos às células endoteliais, amplificando assim a reação (ACKERMANN, 2009; KUMAR, et al., 2010). Isto ocorre devido a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), enzimas proteoglicanas, como as matrizes metaloproteinases (MMP), e elastase dos lisossomos durante a degeneração celular (ACKERMANN, 2009). A transcitose aumentada (transporte transcelular envolvendo vesículas e vacúolos) também pode ser outro mecanismo implicado no aumento da permeabilidade (ACKERMANN, 2009; KUMAR, et al., 2010).

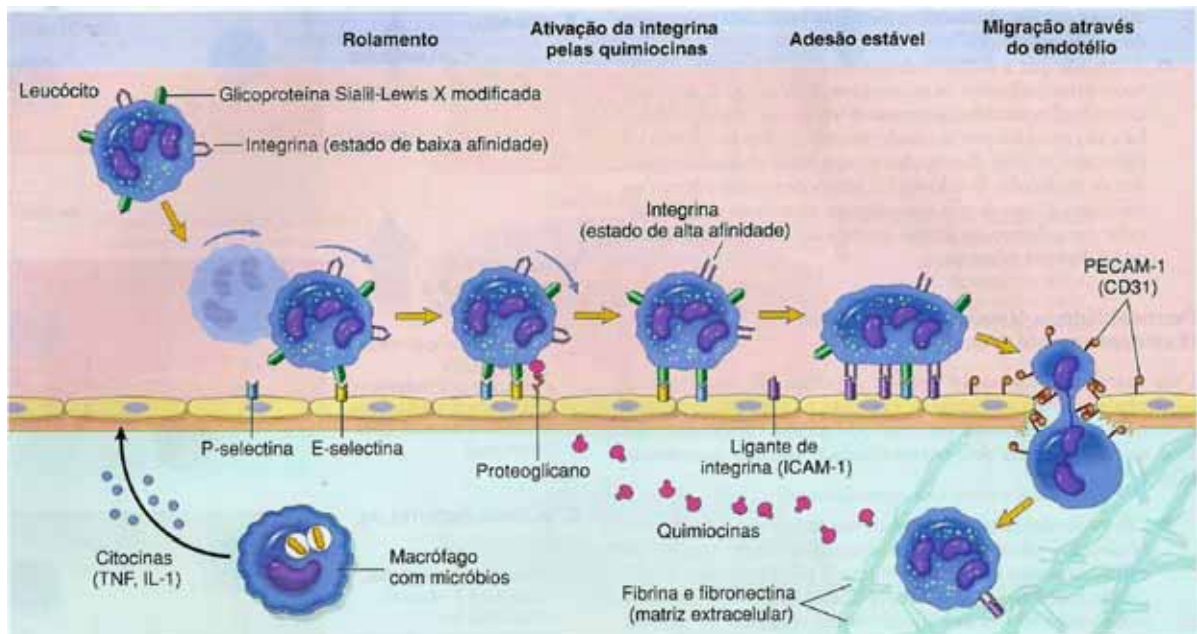
Com a perda de fluidos e o aumento do diâmetro vascular, há lentidão no fluxo sanguíneo, denominado estase. Neste momento, os leucócitos assumem posição periférica ao longo da superfície endotelial, mecanismo este denominado marginalização. Subsequentemente, os leucócitos aderem transitoriamente ao endotélio, se ligando e desligando da parede do vaso (rolamento) até finalmente se

aderirem firmemente. Esta adesão é mediada por moléculas estimuladas por citocinas (KUMAR, et al., 2010).

As citocinas são mediadores endógenos que ao contrário dos mediadores hormonais, produzidos por tecidos especializados, são polipeptídeos ou glicoproteínas produzidas por diversos tipos celulares presentes no local da lesão e, também, por células do sistema imune. Essas citocinas também diferem dos hormônios por não serem armazenadas como moléculas pré-formadas. A presença rápida destas citocinas após a lesão é devido à transcrição do gene ativo e tradução pelas células lesionadas ou estimuladas. As citocinas se ligam a receptores celulares específicos, com consequente ativação de vias de sinalização intracelular que regulam a transcrição do gene. Por este mecanismo, as citocinas influenciam na atividade, na diferenciação, na proliferação e na sobrevivência das células imunes. Esses mediadores também regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem tanto aumentar (pró-inflamatória) ou atenuar (anti-inflamatória) a resposta inflamatória (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000).

Durante a fase de rolamento, as interações iniciais são mediadas por proteínas chamadas selectinas, dos leucócitos (L-selectinas) e endoteliais (E-selectinas e P-selectinas). A expressão destas selectinas está associada aos macrófagos teciduais, mastócitos e células endoteliais que entram em contato com a injúria, pois estas células respondem liberando citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e quimiocinas (citocinas quimioatraentes), que induzem a expressão coordenada de numerosas moléculas de adesão. A ligação de neutrófilos com selectinas, permitem a firme adesão mediada pelas integrinas. O TNF e a IL-1 induzem a expressão endotelial de ligantes para a integrina, o VCAM-1 (molécula-1 de adesão de célula vascular) e o ICAM-1 (molécula-1 de adesão intercelular). Neste mesmo momento, as quimiocinas produzidas no local da injúria se ligam e ativam os leucócitos, permitindo alta afinidade entre as integrinas leucocitárias e os ligantes endoteliais. Após isso, os leucócitos cessam o rolamento, e seus citoesqueletos são reorganizados para atravessarem o endotélio (transmigração ou diapedese) em direção ao gradiente de concentração químico. Para isso, há o envolvimento de várias moléculas de adesão juncional, incluindo a imunoglobulina PECAM-1 (molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta).

Após atravessar o endotélio, os leucócitos penetram na membrana basal secretando colagenase, entrando assim no tecido extravascular onde irão migrar em direção ao gradiente quimiotático (Figura 1) (KUMAR, et al., 2010).



**Figura 1.** Ilustração esquemática das etapas da migração de neutrófilos ao longo dos vasos sanguíneos (KUMAR et al., 2010).

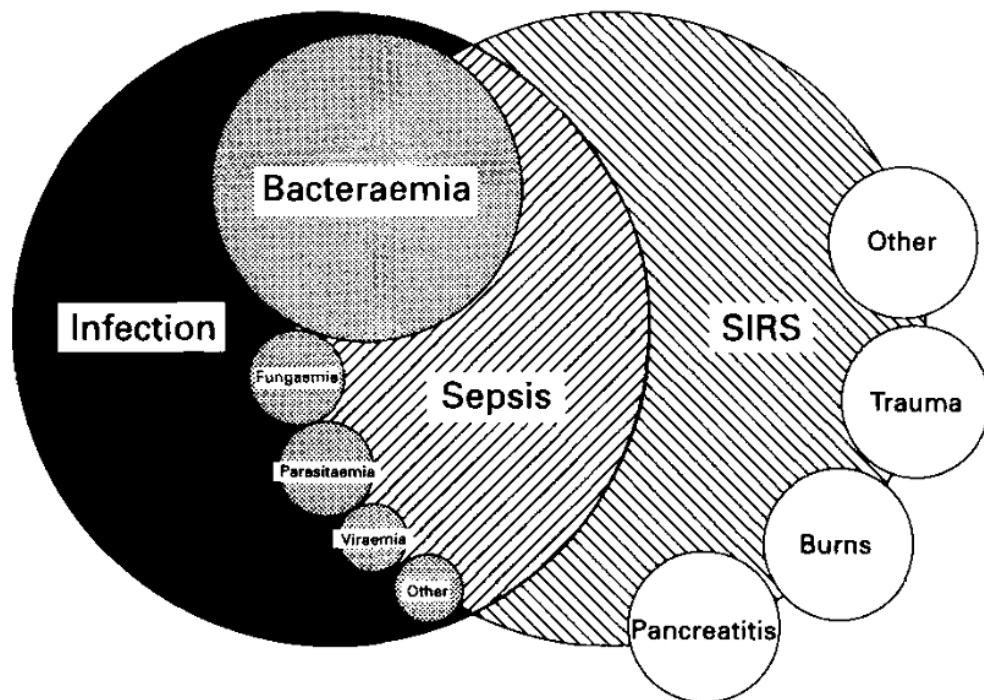
Nos equinos, o processo é particularmente importante uma vez que sua função se destaca na patogenia de muitas doenças graves (FIGUEIREDO et al., 2008). Durante muitos anos, a participação da resposta inflamatória foi investigada nesta espécie em estudos envolvendo afecções do trato gastrointestinal. A realização de pesquisas versando sobre este tema possibilitou o melhor entendimento da fisiopatogenia, tanto da endotoxemia como da injúria de reperfusão (MOORE, 2001; ROWE; WHITE, 2002).

#### 2.4 Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

A terminologia utilizada para identificação do processo inflamatório que se estende pela corrente circulatória aos diferentes órgãos é Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS). Esta denominação é utilizada independentemente da causa, seja ela infecciosa ou não. Entre os inúmeros fatores causais da SIRS se

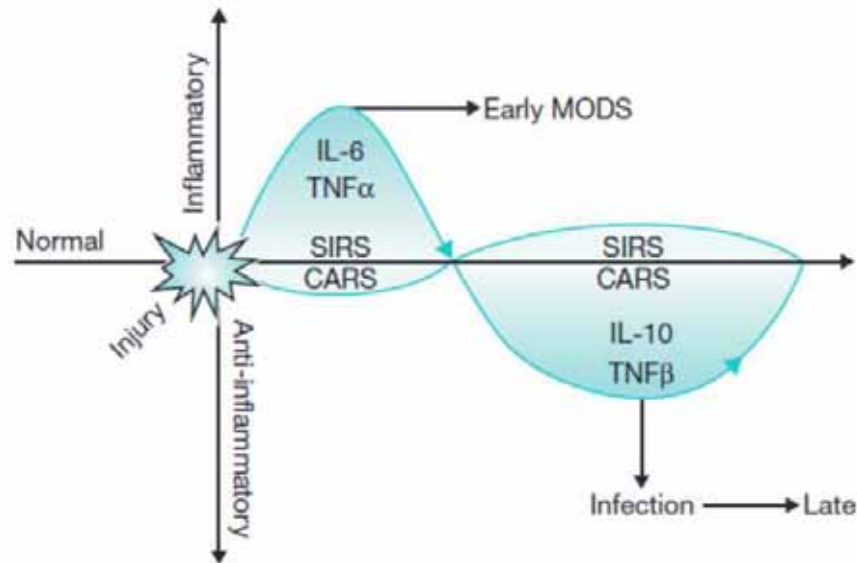
incluem queimaduras, injúrias decorrentes de isquemia e reperfusão, politraumatismo e pancreatite, dentre outras. Todas essas causas induzem no paciente respostas inflamatórias similares. Esta síndrome apresenta variações clínicas severas que vão desde alterações fisiológicas caracterizadas por taquicardia, taquipnéia, febre e leucocitose, até a forma mais grave na qual ocorre choque e falência de múltiplos órgãos, a qual é conhecida como Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (MODS). Para o diagnóstico de SIRS, pelo menos duas ou mais das condições a seguir devem estar presentes: aumento da frequência cardíaca, aumento da frequência respiratória, aumento da temperatura corpórea ou aumento do número de leucócitos circulantes (SHERWOOD; TRABER, 2012).

Na presença de infecção o quadro de SIRS recebe a denominação de sepse (Figura 2). Esta pode se iniciar a partir de infecções locais, em consequência de contaminações bacterianas de feridas decorrentes de queimadura, presença de cateteres infectados ou, ainda, na infecção pulmonar. A propagação de microrganismos e suas toxinas pode potencializar ainda mais a inflamação sistêmica (SHERWOOD; TRABER, 2012). Em equinos, a ocorrência de sepse é comum em potros, sendo a mais trivial a bacteriana neonatal, muitas vezes sem local primário detectável de infecção. Outras causas frequentes são as sepses por enterite infecciosa e pneumonia bacteriana. Em cavalos adultos, a sepse é comumente encontrada durante distúrbios gastrintestinais (cólicas, enterite proximal ou colite), provocadas provavelmente por produtos bacterianos na circulação (endotoxinas), ao invés de infecções bacterianas verdadeiras. Outras condições associadas à sepse em adultos incluem pneumonia bacteriana grave ou pleuropneumonia, retenção de placenta e metrite (ROY, 2004). Neste caso, as bactérias ou suas toxinas podem potencializar a resposta inflamatória sistêmica, causando alterações metabólicas, cardiovasculares, pulmonares, renais e gastrintestinais, além de ativação da cascata de coagulação (SHERWOOD; TRABER, 2012).



**Figura 2.** Inter-relação entre sepse, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e a infecção. Observa-se que a bacteremia pode ou não desenvolver sepse (DAVIES; HAGEN, 1997).

O evento fisiopatológico crucial necessário à indução da inflamação sistêmica é o dano tecidual, sendo este resultado direto de injúria tecidual causada tanto por trauma mecânico ou queimadura, como por isquemia e reperfusão. Após a lesão, se segue rápida liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas (IL) -1 e -6. Posteriormente à esta reação, um novo quadro se desenvolve, o qual recebe a denominação de Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória (CARS). A CARS se caracteriza pela liberação de mediadores anti-inflamatórios, dentre os quais se incluem a IL-10 e o TNF- $\beta$ . Em muitos casos a SIRS e a CARS podem coexistir (Figura 3) (SHERWOOD; TRABER, 2012).



**Figura 3.** Ilustração esquemática da patogênese da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) e da Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória (CARS) (SHERWOOD; TRABER, 2012).

A ativação da cascata de citocinas em resposta à lesão ou à infecção, consiste em uma complexa rede bioquímica, com diversos efeitos sobre o hospedeiro. O TNF- $\alpha$ , por exemplo, está entre os primeiros e mais potentes mediadores da resposta do organismo. As fontes primárias de sua síntese incluem monócitos, macrófagos e células T, os quais são abundantes no peritônio e no baço. Consequentemente, as lesões cirúrgicas ou traumáticas das vísceras abdominais apresentam grande influência na geração de mediadores inflamatórios e de respostas homeostáticas, tais como a produção de proteínas de fase aguda (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). Em regiões de infecção local ou inflamação, o TNF- $\alpha$  inicia a resposta imunológica que ativa os mecanismos de defesa. Uma vez que a infecção é erradicada, inicia-se a reparação tecidual (SHERWOOD; TRABER, 2012). Outra função importante do TNF- $\alpha$  é a ativação da cascata de coagulação, promovendo a expressão ou a liberação de moléculas de adesão, prostaglandina E<sub>2</sub>, fator ativador de plaquetas, glicocorticóides e eicosanóides. Portanto, mesmo com meia-vida inferior a 20 minutos, o TNF- $\alpha$  é capaz de promover alterações

metabólicas e hemodinâmicas e, também, ativar mediadores distais na cascata de citocinas (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000).

Já a IL-1 é liberada principalmente por macrófagos ativados e células endoteliais. Ela é encontrada de duas formas: a IL-1 $\alpha$ , que está predominantemente associada à membranas celulares, e a IL-1 $\beta$ , a qual é mais facilmente detectável na circulação sanguínea (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000) e é capaz de induzir alterações fisiológicas e metabólicas semelhantes às induzidas pelo TNF- $\alpha$  (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; SHERWOOD; TRABER, 2012). Quando o nível de IL-1 e de TNF- $\alpha$  se encontram elevados, estas citocinas, em função do sinergismo que há entre elas, iniciam, de forma independente, um estado de descompensação hemodinâmica. A IL-1 também é responsável pela resposta febril inflamatória, estimulando a atividade da prostaglandina local no hipotálamo anterior. A percepção de dor atenuada após a cirurgia também pode ser mediada por esta citocina, através da liberação de  $\beta$ -endorfinas a partir da glândula pituitária e do aumento do número de receptores de opióide centrais. A meia-vida da IL-1 é de aproximadamente seis minutos, podendo assim realizar seu papel principal como mediador inflamatória local (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000).

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 são potentes indutores da produção de IL-6, a partir da estimulação de todas as células e tecidos (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). A sua principal função está associada a indução da secreção de proteínas de fase aguda no fígado, mas pode atuar ainda como fator de crescimento e diferenciação de linfócitos B (SHERWOOD; TRABER, 2012). Em casos cirúrgicos, sua presença na circulação parece estar associada ao grau da lesão e não à duração do procedimento. As concentrações de IL-6 são detectáveis cerca de 60 minutos após a lesão, com o pico alcançado entre quatro e seis horas, podendo persistir durante 10 dias (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). No entanto, a presença desta citocina na circulação tem sido associada a mau prognóstico em pacientes com traumatismos, por estar associada a inflamação em curso (SHERWOOD; TRABER, 2012).

A IL-8, pertence à família das quimiocinas, é uma proteína que possui função quimiotática de leucócitos e, quando produzida de forma inadequada ou em excesso, prejudica a inflamação sistêmica ou local (SHERWOOD; TRABER, 2012). A expressão desta quimiocina, assim como sua atividade, estão associadas à da IL-

6, e tem sido proposta como um biomarcador adicional para o risco de MODS. Diferentemente do TNF- $\alpha$  e da IL-1, a IL-8 não produz instabilidade hemodinâmica (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000), porém é potente quimiotático e ativador de neutrófilos (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; SHERWOOD; TRABER, 2012).

Já a IL-10, citocina anti-inflamatória, tem a função de modular a atividade do TNF- $\alpha$  (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). Esta citocina também suprime metaloproteínas e estimula inibidores de MMP em macrófagos, o que preserva a matriz celular (MOURA; POMERANTZEFF; GOMES, 2001). Em experimentos, a indução da transcrição de IL-10 demonstrou atenuação da resposta inflamatória sistêmica e reduziu a taxa de mortalidade durante a peritonite séptica (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000).

## **2.5 Endotoxemia**

A endotoxemia é um quadro clínico causado pela presença de endotoxinas (lipopolissacarídeos; LPS) de origem bacteriana na corrente circulatória. Os LPS se encontram presentes na membrana externa de bactérias Gram negativas que compõem, juntamente com organismos Gram positivos e protozoários, a flora microbiana do trato gastrintestinal de cavalos. As endotoxinas são liberadas quando ocorre replicação rápida, lise ou morte bacteriana (KUESIS; SPIER, 2000; MOORE, 2001; CAMPEBELL et al., 2007). Os cavalos são particularmente sensíveis aos efeitos das endotoxinas. Concentrações plasmáticas na faixa de  $10^{-10}$  a  $10^{-7}$  g/mL, estão associados a presença de sinais clínicos severos, incluindo distúrbios cardiovasculares e hemodinâmicos (KING; GERRING, 1988; BEHRE et al., 1992; URIU et al., 2002). A primeira linha de defesa dos equinos às endotoxinas é a mucosa intestinal intacta, porém caso esta esteja comprometida, ocorre ativação de células fagocitárias, linfócitos e TNF, incluindo imunoglobulinas, complemento e reagentes de fase aguda que constituem os mecanismos secundários de defesa (KUESIS; SPIER, 2000).

Após o LPS alcançar a circulação, ele pode se ligar a proteínas circulantes ou ser removido por macrófagos fixos do fígado, do baço e da vasculatura pulmonar. Devido a região hidrofóbica das endotoxinas, elas tendem a formar agregados no plasma interagindo com lipoproteínas de alta densidade, prolongando a meia-vida do

LPS na circulação, mas reduz a capacidade de interação com células pró-inflamatórias. Em contraste direto, a união do LPS a proteína ligante de lipopolissacarídeos, remove esta molécula do agregado, facilitando sua interação com um receptor de superfície celular CD14, existente em fagócitos mononucleares. Entretanto, tem-se verificado que a transmissão do sinal para o interior da célula depende da participação de receptores toll-like, o qual ativa a síntese de mediadores pró-inflamatórios (MOORE, 2001). Nos seres humanos, dez receptores toll-like foram descritos, e a lista de ligantes microbianos específicos, é crescente (ANNANE; BELLISANT; CAVAILLON, 2005). Nos monócitos de equinos apenas os receptores toll-like 2, 3, 4, 6 e 9 possuem expressões demonstradas (FIGUEIREDO et al., 2008). Estes são responsáveis pelo início da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997; BOWIE; O'NEILL, 2000; FLO et al., 2001), interferons e citocinas anti-inflamatórias (BEUTLER, 2004).

O sinal de transdução após a interação entre o ligante (LPS) e o receptor toll-like 4 resulta na ativação de adaptadores moleculares intracelular como o MyD88 (proteína de diferenciação mieloide) e o TRIF (adaptador proteico de receptores citoplasmáticos de toll-interleucina-1 indutor de interferon  $\beta$ ) e com proteínas quinases (ANNANE; BELLISANT; CAVAILLON, 2005; FIGUEIREDO et al., 2008). A interação direta do MyD88 com o receptor toll-like resultará na ativação e na transcrição nuclear do fator- $\kappa$ B. Já a interação com o adaptador molecular TRIF, resultará na ativação de fatores nucleares reguladores de interferon, promovendo a produção de interferon  $\beta$ . Adicionalmente, no citoplasma e na superfície celular, estão presentes moléculas que controlam negativamente a sinalização da cascata, como o MyD88s, Tollip, supressor de sinalização de citocina 1, ST2 entre outros (Figura 4) (ANNANE; BELLISANT; CAVAILLON, 2005). A ativação de múltiplos caminhos de sinalização intracelular pelo LPS, induz a desregulação da resposta inflamatória sistêmica (NEUDER et al., 2009).



laminar e ativação de plaquetas (tromboses) nos vasos laminares (BELKNAP; BLACK, 2005). Os processos infecciosos, decorrentes de metrite, pleuropneumonia e distúrbios gastrintestinais estão associados ao desenvolvimento de sepse, na qual a migração de leucócitos para o meio extravascular constitui papel importante (COHEN, 2002). A ativação de leucócitos e do endotélio vascular por meio de produtos bacterianos (endotoxinas/LPS) e citocinas, resulta na produção de selectinas, integrinas e quimiocinas as quais são necessárias para adesão inicial e subsequente migração transendotelial de leucócitos para o interstício (ANNANE; BELLISANT; CAVAILLON, 2005). No espaço extravascular, os leucócitos produzem citocinas, MMP e ROS, responsáveis pelas lesões teciduais e decorrente falência de órgãos (WERNERS; BULL; FINK-GREMMELS, 2005). Em estudo comparativo entre o fígado, a pele e o tecido laminar podal, observou-se que a presença de superóxido dismutase no casco é mínima, podendo ser esta, uma das razões para as catastróficas lesões limitadas ao dígito dos equinos acometidos por laminite (BELKNAP; BLACK, 2005; LOFTUS et al., 2007a).

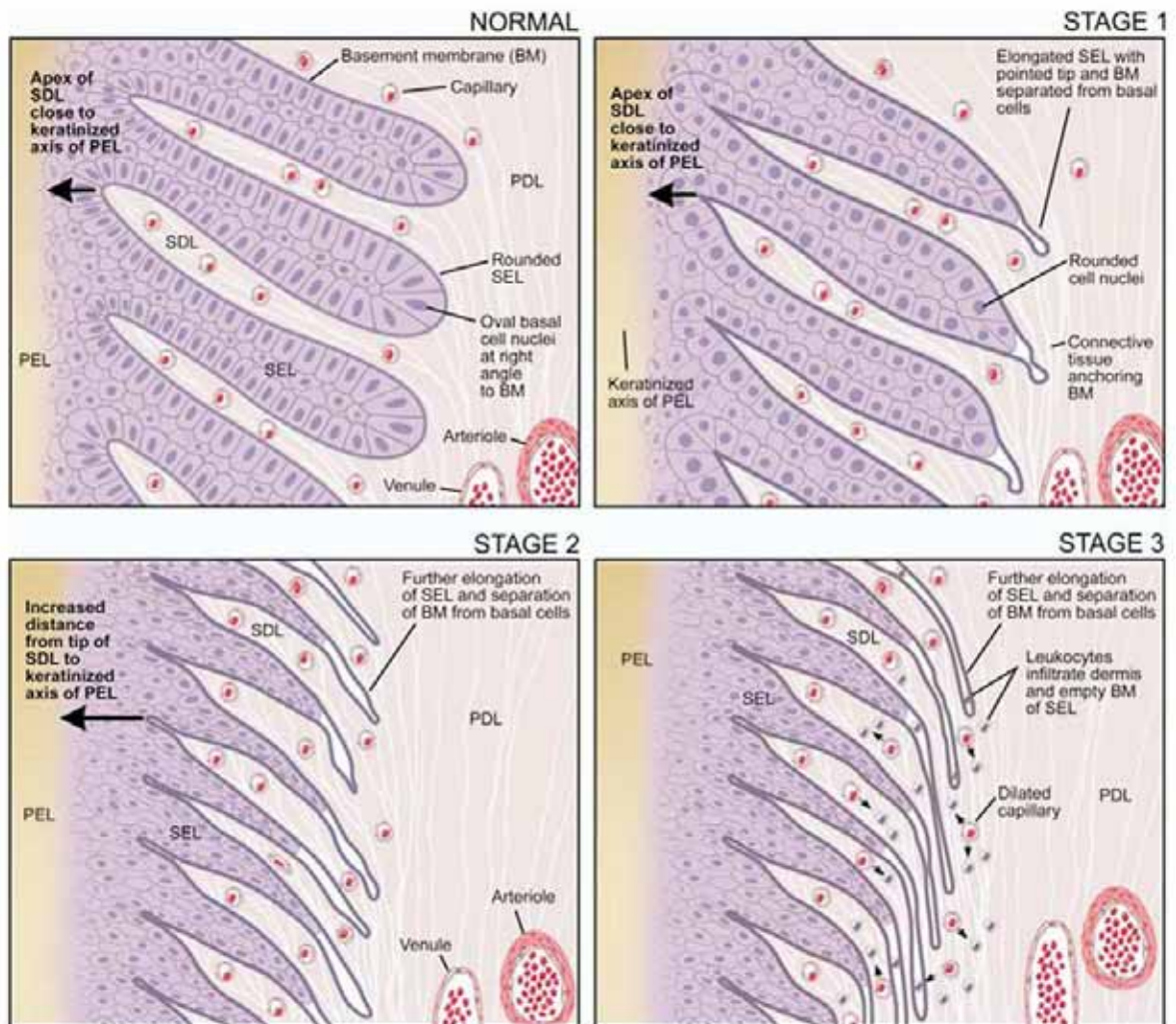
Estudos de indução de laminite em equinos com extrato de noqueira preta, demonstraram aumento no número de leucócitos no espaço extravascular da lâmina dérmica do casco, algumas horas após a administração. Estes achados indicam que a falência laminar, na laminite equina, ocorre de forma similar aos mecanismos fisiopatológicos descritos na falência de órgãos na sepse humana (BLACK et al., 2006). Em estudos onde a laminite foi induzida pela administração de sobrecarga de carboidratos, foram registrados fenômenos inflamatórios de mesma natureza (EADES; STOKES; MOORE, 2004) porém o tempo de desenvolvimento foi mais demorado ao comparado com o extrato de noqueira preta (BELKNAP; BLACK, 2005).

Aparentemente, a ativação de neutrófilos que ocorre no desenvolvimento de processos inflamatórios pode ser responsável pela liberação de MMP no espaço extravascular (LOFTUS; BELKNAP; BLACK, 2006). As MMP são secretadas como pró-enzimas e requerem a clivagem do peptídeo N-terminal para serem ativadas. Estas MMP são responsáveis pela degradação de colágenos durante o remodelamento fisiológico da matriz extracelular (JOHNSON et al., 1998). Tanto a gelatinase-A (MMP-2) como a gelatinase-B (MMP-9) são capazes de degradar

componentes da MB como a laminina, o colágeno tipo IV e o colágeno tipo V, podendo estarem relacionadas com o processo destrutivo inflamatório que leva a laminite crônica (LOFTUS; BELKNAP; BLACK, 2006).

Segundo Belknap; Black (2005) não se descarta qualquer das hipóteses anteriores quanto aos mecanismos fisiopatológicos nos estágios iniciais. A adição da migração de leucócitos e da expressão de mediadores inflamatórios pode associar várias hipóteses, pois os pacientes equinos acometidos por doenças que os colocam em risco de adquirirem laminite são análogos aos pacientes humanos que apresentam sinais de sepse.

Segundo Pollitt (2004), as alterações histológicas que ocorrem no tecido laminar podem ser classificadas em três graus (Figura 5). No início do desenvolvimento (grau 1), as células basais perdem sua forma normal, tornando as lâminas epidérmicas secundárias (LES) mais alongadas. Enquanto isso, a membrana basal (MB) perde sua ligação com as células basais, formando pequenas bolhas nas pontas das LES. No decorrer do desenvolvimento (grau 2), a separação da MB com a LES se agrava, devido a movimentação do pé do equino. Com isso a MB se retrai, levando consigo a lâmina dérmica secundária, formada de tecido conjuntivo e capilares. As células basais que perderam sua fixação com a MB, se agrupam próximo ao eixo queratinizado da lâmina epidérmica primária, aumentando a distância entre este eixo e a MB. Na fase mais desenvolvida da doença (grau 3), a separação da membrana basal é total, primeiramente vista somente pela microscopia, porém com a evolução do quadro, a distância entre o casco e a falange distal pode ser mensurada em milímetros. Uma vez que a MB é a estrutura fundamental de união entre a epiderme e o tecido conjuntivo que se une a falange distal, esta desorganização da MB leva a falência anatômica do casco.



**Figura 5.** Ilustração esquemática mostrando a histologia laminar normal e os três graus de desenvolvimento histopatológico da laminite (POLLITT, 2004).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Gerais

Estudar os efeitos da distensão do cólon menor de equinos sobre a resposta inflamatória, tanto sistêmico como local, assim como as alterações clínicas associadas à esta condição.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar o uso da bola sob pressão de 80 mm de Hg na indução de lesão no cólon menor;
- Avaliar as alterações clínicas decorrente da obstrução intraluminal não estrangulativa do cólon menor, por meio de exames físicos;
- Avaliar as alterações hematológicas e peritoneais causadas pela obstrução do cólon menor, por meio de análises eritroleucométricas;
- Avaliar a expressão gênica de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  em leucócitos do sangue venoso e líquido peritoneal, e em tecidos (cólon menor e tecido laminar do casco), por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR);
- Avaliar alterações nos níveis séricos e do líquido peritoneal de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  pelo método de Elisa;
- Avaliar as alterações histopatológicas em cólon e tecido laminar podal provocadas por este modelo experimental;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

O protocolo experimental realizado no presente estudo está de acordo com os princípios éticos na 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 Veterinárias / Unesp – Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 007568-09).

Foram utilizados oito equinos, adultos, hígidos, quatro machos e quatro fêmeas, 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 da higidez, utilizando-se apenas animais sadios. Também foram submetidos a exames radiográficos (nas posições dorso-palmar e látero-medial) da porção distal dos membros torácicos (falanges média e distal) para verificação da higidez podal. Os equinos estavam com escore corporal bom e passaram por programas de desverminação<sup>1</sup> e controle de ectoparasitas<sup>2</sup>. Os animais 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 (*Cynodon dactylon*); 1% do peso vivo em ração comercial balanceada; sal mineral e água *ad libitum*.

### 4.2 Exames Físicos

Os equinos foram submetidos a exames físicos imediatamente antes do procedimento cirúrgico e, posteriormente, a cada 12 horas, até atingir 72 horas após a cirurgia, observando-se, mediante auscultação torácica, as frequências cardíaca (determinada em batimentos por minuto, bpm) e respiratória (medida em movimentos por minuto, mpm); avaliando-se a perfusão das mucosas, classificadas de acordo com a coloração (em rósea, pálida, azulada, vermelho vivo ou vermelho-

---

<sup>1</sup> Equalan®. Merial Saúde Animal LTDA. São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup> Butox® P CE 25 – Intervet Brasil, Akzo Nobel Ltda. São Paulo, SP, Brasil

tijolo) e de acordo com a determinação do tempo de preenchimento capilar (TPC) por meio de compressão digital da mucosa gengival dos dentes incisivos e determinação do tempo, em segundos, de retorno à coloração anterior; apreciação da atividade intestinal mediante auscultação abdominal, determinando-se ausência de borborigmos, atividade intestinal diminuída, normal ou aumentada; avaliação do turgor cutâneo por meio da determinação do tempo de retorno a posição normal após realização de pregueamento da pele na região lateral do pescoço (classificação em normal [+], pouco diminuído [++] e muito diminuído [+++]); determinação da temperatura retal mediante utilização de termômetro de bulbo de mercúrio (em graus Celsius). Sinais clínicos característicos referentes a desconforto abdominal também foram avaliados ao longo dos dias.

### **4.3 Preparo dos animais**

No dia anterior ao procedimento cirúrgico, os equinos tiveram seus cascos limpos com água e sabão e foram posteriormente mantidos em troncos de contenção. Os animais foram então tricotomizados na região abdominal ventral, delimitada cranialmente pelo xifoide, caudalmente pela região do púbis e dorsoventralmente pelas regiões paramedianas ventrais direita e esquerda. Posteriormente, realizou-se cateterização da veia jugular esquerda para facilitação das colheitas de sangue e, também, para posterior administração de medicamentos, e hidratação no período pós cirúrgico. Este procedimento foi realizado mediante aplicação de cateter mono lúmen<sup>3</sup> 14 G x 20 cm, em sentido caudal (seguindo o fluxo sanguíneo).

Neste mesmo dia, foram colhidos amostras de sangue venoso e de líquido peritoneal relativas ao controle, conforme descrito nos itens 4.7 e 4.8. Em seguida, os animais foram sedados com cloridrato de detomidina 10%<sup>4</sup> (0,01 mg/kg) por via intravenosa para a realização do orifício no casco. Com o auxílio de uma pedra de esmerilar à base de óxido de alumínio, removeram-se os extratos externo e médio da muralha do casco. Posteriormente, os cascos dos membros torácicos foram enfaixados com atadura de crepom<sup>5</sup> e recobertos com esparadrapo para manutenção da limpeza.

---

<sup>3</sup> Central Venous Catheterization Set with Blue FlexTip® Catheter, Arrow International Inc. - Reading, PA, EUA

<sup>4</sup> Dormium V®, Agener União Saúde Animal - Embu-Guaçu, SP, Brasil

<sup>5</sup> NEVE Ind. e Comercio de Prod. Cirúrgicos LTDA - São Paulo, SP, Brasil

Em seguida, os equinos foram realocados nas baias e mantidos em jejum alimentar e hídrico de 24 e 12 horas, respectivamente.

#### 4.4 Procedimento Anestésico

O procedimento anestésico utilizado para a celiotomia constituiu na administração intravenosa de cloridrato de detomidina 10% (0,015 mg/kg) como medicação pré-anestésica. Após 10 minutos, realizou-se indução anestésica por meio da administração de cetamina 10%<sup>6</sup> (2,0 mg/kg) à qual seguiu a administração de maleato de midazolam<sup>7</sup> (0,1 mg/kg), levando o animal ao decúbito lateral esquerdo. Ato contínuo se realizou intubação orotraqueal e o posicionamento do animal em decúbito dorsal, sobre a mesa cirúrgica. A anestesia inalatória foi mantida com isoflurano<sup>8</sup> vaporizado em oxigênio, em circuito semi-fechado, sob ventilação controlada. Para manutenção da pressão arterial média (PAM) foram utilizados 0,002 mg/kg/min de dobutamina<sup>9</sup>, durante todo o procedimento cirúrgico. Também foram administrados 5% do peso corpóreo de solução de Ringer com lactato<sup>10</sup> por dia (IV) para a manutenção da volemia, até completar 72 horas de pós-cirúrgico.

#### 4.5 Procedimento Cirúrgico

A intervenção cirúrgica ocorreu com os equinos em decúbito dorsal, após antisepsia do campo cirúrgico com polivinilpirrolidona-iodo tópico a 10%. Para a realização da obstrução intraluminal do cólon menor, realizou-se celiotomia por meio de incisão mediana retro-umbilical. A escolha do segmento foi realizada observando-se a presença de ramos da artéria mesentérica que irrigam esta região. Após a identificação do local a ser obstruído, verificou-se o posicionamento da porção oral e aboral do cólon menor. Em seguida, a borda antimesentérica foi incisada, aboral ao segmento a ser distendido. Através deste orifício, uma bola<sup>11</sup> (diâmetro de 13 cm), estéril e desinflada foi introduzida no lúmen do cólon menor em sentido oral. Após o posicionamento adequado, esta foi inflada com ar até atingir a pressão de 80 mm de

---

<sup>6</sup> Cetamin<sup>®</sup>, Syntec do Brasil Ltda - Cotia, SP, Brasil

<sup>7</sup> Dormonid<sup>®</sup>, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. - Rio de Janeiro, RJ, Brasil

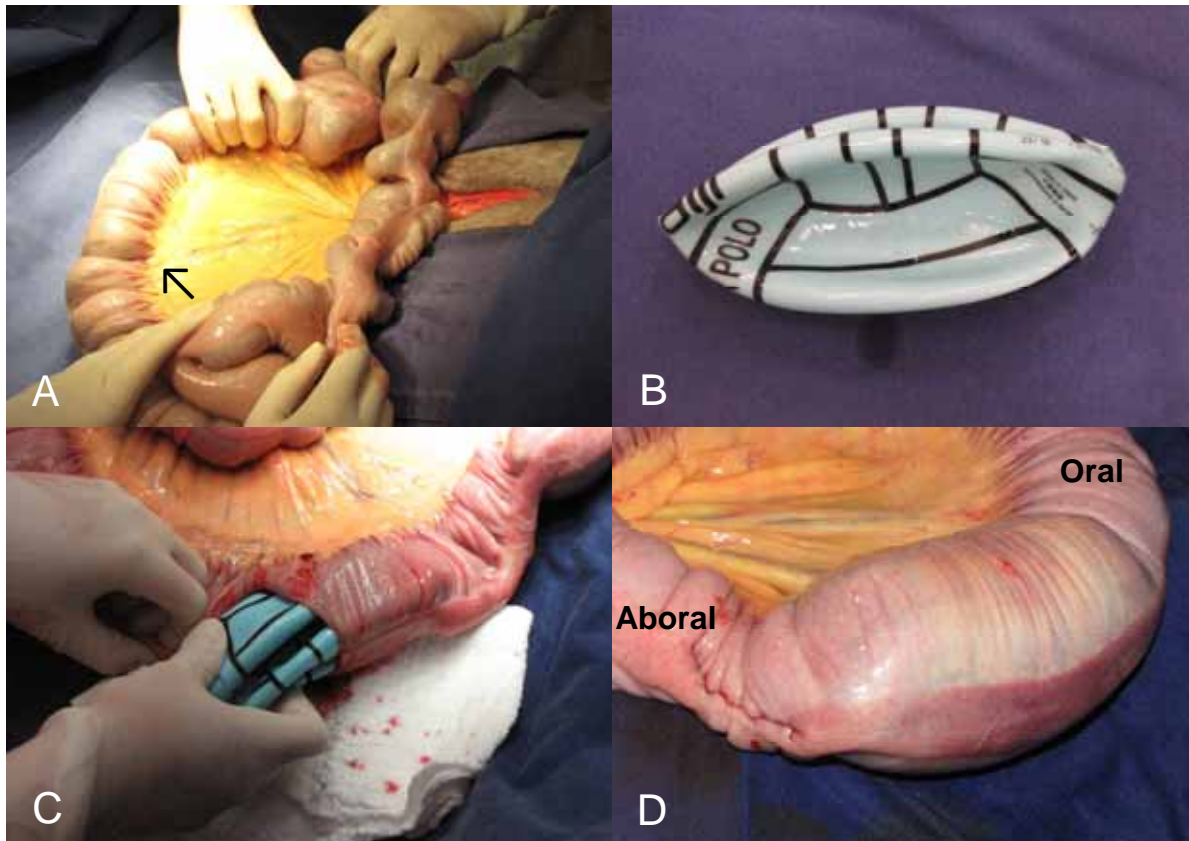
<sup>8</sup> Isoforine<sup>®</sup>, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. - Itapira, SP, Brasil

<sup>9</sup> Cloridrato de dobutamina, NovaFarma Industria Farmacêutica - Anápolis, Go, Brasil

<sup>10</sup> JP Indústria Farmacêutica S.A. - Ribeirão Preto, SP, Brasil.

<sup>11</sup> Water Polo Nabaiji

Hg, aferida por esfigmomanômetro. Com a bola já insuflada, realizou-se a enterorrafia com fio poliglactina 910 n° 2-0<sup>12</sup> (Figura 6). Ato contínuo, o segmento intestinal foi realocado na cavidade abdominal e a incisão da mesma foi reduzida utilizando pinças Allis.



**Figura 6.** Imagem fotográfica do procedimento de celiotomia para obstrução do cólon menor em equino. (A) escolha do segmento a ser manipulado, com observação dos ramos das artérias mesentéricas (seta). (B) Bola estéril, pronta para o procedimento a ser desenvolvido. (C) Introdução da bola de látex no lúmen do colón menor. (D) Bola posicionada e inflada no lúmen do segmento do cólon menor.

Durante quatro horas os animais foram mantidos em decúbito dorsal, sob anestesia inalatória. Imediatamente após este período, o cólon menor foi novamente exposto para remoção da bola. Realizou-se nova incisão na porção antimesentérica, na qual objetivou-se também perfurar a bola. Após estar totalmente desinflada, esta foi removida do lúmen intestinal pela incisão. A enterorrafia foi novamente realizada

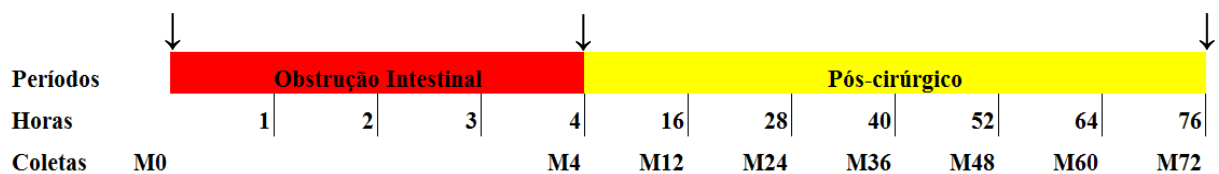
<sup>12</sup> Vicryl®, Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda. - São José dos Campos, SP, Brasil

com fio de poliglactina 910 n° 2-0. Posteriormente, o cólon menor foi reposicionado na cavidade abdominal.

As enterorragias 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 Sultan empregando-se fio de nylon 0,60 agulhado com agulha 40x12<sup>13</sup>. O tecido subcutâneo foi aproximado com sutura contínua padrão "zig-zag" com fio de poliglactina 910 n° 0<sup>14</sup>, e a dermorráfia foi realizada em padrão Wolff, também com fio nylon 0,60 agulhado com agulha 40x12. Em seguida, realizado-se curativo na sutura de pele com gaze estéril e protegida com fita adesiva de polietileno reforçado com tecido de algodão<sup>15</sup>. Os animais foram retirados do centro cirúrgico e acomodados em sala de recuperação anestésica, emborrachada, objetivando minimizar eventualidades no momento do retorno da anestesia.

#### 4.6 Biópsia do cólon menor

As amostras de cólon menor foram coletadas antes da introdução da bola (M0) e no momento da desobstrução (M4). Em M0, o fragmento coletado foi no local da incisão para a introdução da bola, na borda antimesentérica. Já em M4, foram coletados 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 (Figura 7).



**Figura 7.** Diagrama demonstrando o esquema do procedimento experimental da obstrução intraluminal do cólon menor de equinos. As setas indicam os momentos de colheitas das amostras teciduais.

<sup>13</sup> Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda. - Curitiba, PR, Brasil

<sup>14</sup> Vicryl®, Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda. - São José dos Campos, SP, Brasil

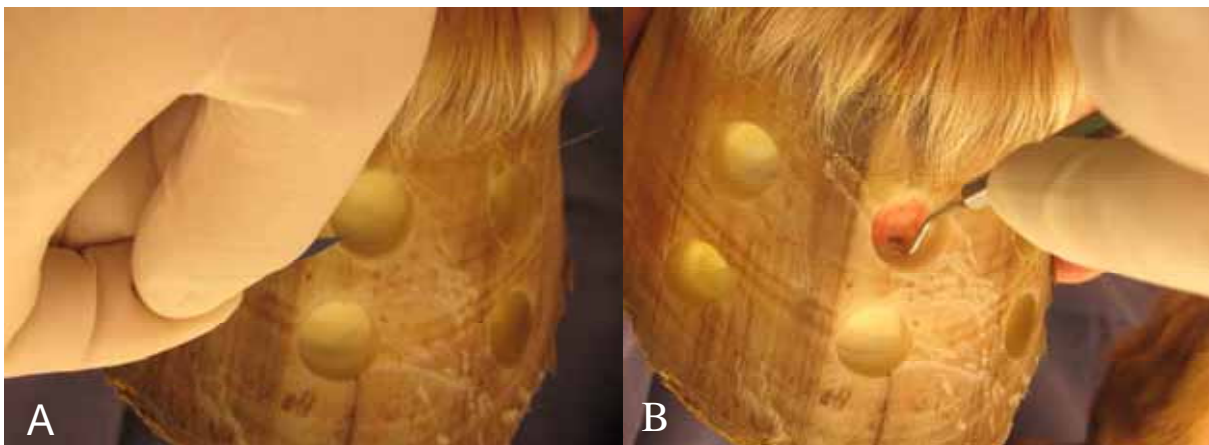
<sup>15</sup> Silver Tape®, 3M, Sumaré, SP, Brasil.

A coleta destas amostras foram efetuadas com tesoura de Maio 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 nº 2-0 como descritas anteriormente.

#### 4.7 Biópsia do casco

As amostras do casco (tecido laminar) foram coletadas em M0 e M4 por meio da técnica descrita por GRAVENA et al. (2012), com modificações somente no procedimento anestésico, já descrito anteriormente.

Com a parede do casco já perfurada, realizou-se a antissepsia do orifício, com povidona-iodo degermante e tintura de iodo a 5%. O local foi secado com gaze estéril e, utilizando-se uma lâmina de bisturi nº 11 descartável, foram efetuadas quatro incisões laterais profundas das lâminas até alcançar a falange distal, formando um quadrado. O núcleo do material foi então elevado com pinça de dissecação e desprendido da falange distal com um esculpador Frahm 02 (Figura 8). Após a retirada do material, os locais de biópsia foram secados e recobertos com gaze estéril, enfaixados e protegidos com fita adesiva de polietileno reforçado com tecido de algodão.



**Figura 8.** Imagem fotográfica do procedimento de biópsia do casco de equino submetido à obstrução do cólon menor. (A) Corte das lâminas epidérmicas e dérmicas podais com lâmina de bisturi nº 11. (B) Descolamento da lâmina dérmica da falange distal com o auxílio do esculpador Frahm 02.

#### **4.8 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), no momento em que a bola foi desinflada (M4) e, posteriormente, a intervalos de 12 horas durante o pós cirúrgico até completar 72 horas (M12, M24, M36, M48, M60 e M72). Estas amostras foram armazenadas em tubos de coletas a vácuo contendo EDTA (ácido etilenediamonotetracético) para realização imediata da análise eritroleucométrica (subitem 4.12.1).

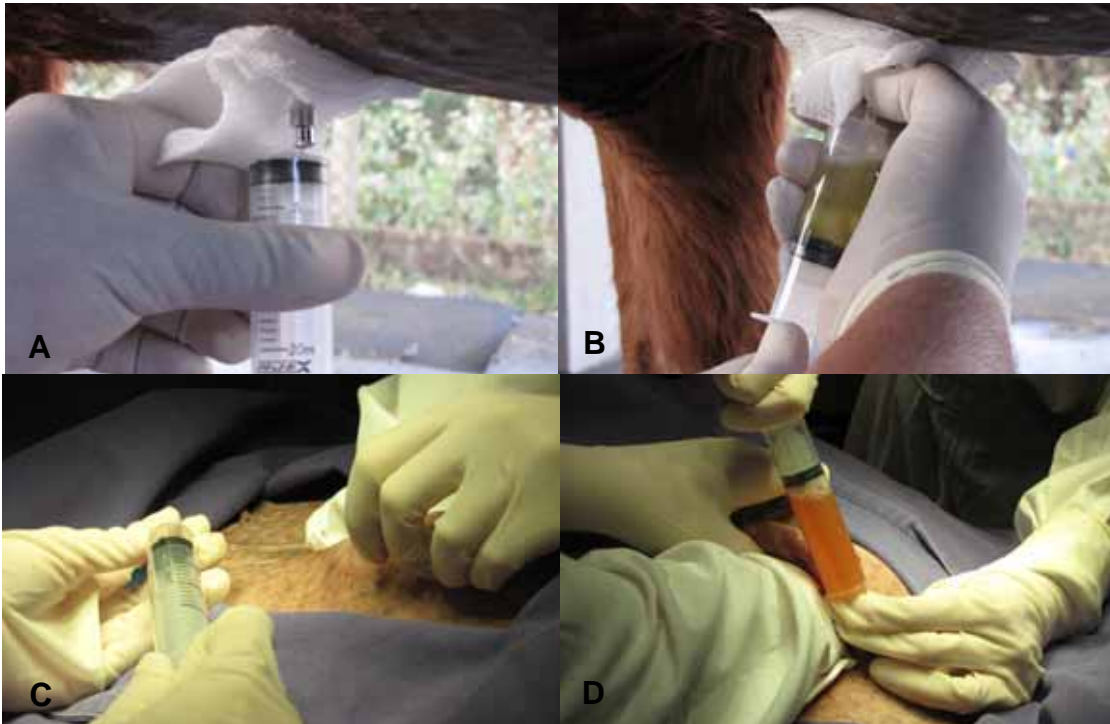
Nos momentos M0, M4 e M72, também foram colhidas amostras de sangue total e após serem processadas, foram alocados (sangue e soro) em criotubos e congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Foi realizada a separação dos leucócitos para extração de mRNA para posterior análise da expressão gênica das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  pelo método de PCR em tempo real (subitem 4.12.3). Com as amostras de soro, realizou-se a quantificação dos níveis de IL-1 $\beta$ , 6 e TNF- $\alpha$  pelo método de ELISA sanduíche (subitem 4.12.2).

#### **4.9 Colheita e processamento do líquido peritoneal**

As amostras do líquido peritoneal foram colhidas em M0, M12, M24, M48 e M72 com o auxílio de uma cânula mamária estéril, após pequena incisão da pele na região da linha alba abdominal, aproximadamente seis centímetros caudal ao processo xifóide. Em M4, a colheita foi obtida pela incisão cirúrgica com o auxílio de sonda uretral descartável número 14<sup>16</sup>, cuja extremidade distal fora acoplada em seringa de 20 mL (Figura 9).

---

<sup>16</sup> Sonda uretral n° 14 RG PVC. Embramed. Jurubatuba, SP, Brasil



**Figura 9.** Imagem fotográfica do procedimento de colheita de líquido peritoneal em equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. (A) Seringa de 20 mL acoplada após a inserção da cânula mamária na cavidade abdominal com o animal em posição quadrupedal. (B) Obtenção do líquido peritoneal em M0. (C) Acoplamento da seringa de 20 mL na sonda uretral n° 14, com o equino mantido em decúbito dorsal. (D) Obtenção do líquido peritoneal em M4.

Em todos os momentos, as amostras foram armazenadas em frascos estéreis contendo EDTA para a análise de celularidade. Em M0, M4 e M72 também foram colhidas amostras em tubos estéreis com anticoagulante (EDTA) para análise da expressão gênica de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ , pelo método de PCR em tempo real e quantificação dos níveis das IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , por meio de ELISA sanduíche.

#### 4.10 Cuidados pós-cirúrgicos

No período pós-cirúrgico imediato, os animais receberam ceftiofur sódico<sup>17</sup> (2,2 mg/kg a cada 12 horas por via intravenosa), cloridrato de tramadol<sup>18</sup> (1,1 mg/kg a cada seis horas, dividindo equitativamente o volume determinado em administração por via intravenosa e por via intramuscular) e o butilbrometo de

<sup>17</sup> Minoxel 8G®, Lapisa, S.A. de C.V. - Guadalajara, Mexico

<sup>18</sup> Tramal®, Laboratórios Pfizer Ltda. - Guarulhos, SP, Brasil

escopolamina<sup>19</sup> (0,2 mg/kg a cada 6 horas por via intravenosa) durante três dias consecutivos após a celiotomia. Curativos na ferida cirúrgica foram realizados a cada 12 horas com polivinilpirrolidona-iodo tópico a 1%. Durante todo o pós-cirúrgico os animais foram alimentados apenas com capim fresco, feno de Tifton e água à vontade.

#### **4.11 Eutanásia e Necropsia**

Decorridas 72 horas da desobstrução intestinal (M72), os animais foram submetidos à eutanásia, mediante tranquilização com acepromazina 1%<sup>20</sup> na dose de 0,1 mg/kg por via intravenosa (IV), indução anestésica com tiopental sódico<sup>21</sup> na dose de 5 mg/kg IV, seguida de injeção por via intratecal de cloridrato de lidocaína 2%<sup>22</sup>, sem vasoconstritor, na dose de 2,5 mg/kg. Imediatamente após a morte do animal, foi realizada a necropsia, onde foram coletadas três amostras de cólon menor (local da obstrução, porção oral e aboral) e, também, amostras de casco.

#### **4.12 Procedimentos laboratoriais**

##### **4.12.1 Avaliação eritroleucométrica e citológica do líquido peritoneal**

De cada amostra colhida com anticoagulante EDTA, foram aferidos os dados relativos às contagens de hemácias e leucócitos totais, plaquetas, teor de hemoglobina sanguínea e hematócrito em contador de células automático<sup>23</sup>. As contagens diferenciais dos leucócitos sanguíneos foram realizadas em esfregaços corados com May-Grunwald-Giemsa. Determinada a contagem diferencial, os valores percentuais foram multiplicados pela contagem de leucócitos determinando as concentrações absolutas dos diversos leucócitos. Estes procedimentos foram efetuados no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

---

<sup>19</sup> Buscopan®, Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda. - Itapicirica da Serra, SP, Brasil

<sup>20</sup> Acepran®, Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. - Louveiro, SP, Brasil

<sup>21</sup> Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. - Itapira, SP, Brasil

<sup>22</sup> Xylestesin®, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. - Itapira, SP, Brasil

<sup>23</sup> Pock-100 iV Diff®, Sysmex do Brasil Indústria e Comércio Ltda. - São José dos Pinhais, PR, Brasil

#### 4.12.2 ELISA sanduíche

A quantificação dos níveis das IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  foi realizada no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, com kits comerciais espécie específico e específicos para cada interleucina<sup>24</sup>. Para a curva-padrão, foram efetuadas oito diluições (1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL, 15,6 pg/mL e 0 pg/mL).

Para montagem da placa foram adicionados 100  $\mu$ L das diluições e de cada amostras em poços individuais e a placa foi homogeneizada suavemente e incubada por duas horas a 37°C. Após este período, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 100  $\mu$ L do reagente A, o qual foi homogeneizado suavemente e a incubação se prolongou por mais uma hora a 37°C. Em sequência, descartou-se o sobrenadante e realizou-se três lavagens com duração de dois minutos cada, com 350  $\mu$ L da solução de lavagem do kit. Posteriormente, 100  $\mu$ L de reagente B foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Em seguida, descartou-se novamente o sobrenadante e a lavagem foi repetida 5 vezes, para depois incubar as amostras por 15 minutos com o substrato TMB. Nesta etapa, a placa foi recoberta com papel alumínio para bloquear a luminosidade. Ao término da incubação foram adicionados 50  $\mu$ L de solução para parada da reação, realizando-se a leitura imediatamente após, em leitor de microplaca<sup>25</sup> com absorbância de 450 nm.

#### 4.12.3 qRT-PCR em Tempo Real

Todo o processamento do qRT-PCR em tempo real das amostras de sangue, líquido peritoneal, casco e cólon foram realizadas no Laboratorio de Imunologia Aplicada, do Departamento de Imunologia, na Universidade de Campinas - UNICAMP, SP.

---

<sup>24</sup> USCN Life Science Inc., Houston, TX, EUA

<sup>25</sup> iMark Microplate Reader, Bio-Rad, Japão.

#### 4.12.3.1 Extração de RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)

O protocolo de extração de RNA com Trizol<sup>26</sup> foi conduzido seguindo-se as otimizações propostas por CHOMCZYNSKI; SACCHI (2006), com pequenas modificações da técnica de acordo com os tecidos utilizados. As amostras contendo em torno de  $1 \times 10^7$  células foram pipetadas e rapidamente transferidas a um microtubo de polipropileno tipo eppendorf (1,5 mL), contendo 1000  $\mu$ L de Trizol. Posteriormente, cada amostra foi homogeneizada e incubada a 30°C por cinco minutos, para permitir a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida, centrifugou-se a 12000 g por 10 minutos a 4°C, com o intuito de remover possíveis restos de membrana, proteínas, entre outros debris celulares. O sobrenadante foi colhido e transferido para outro microtubo de 1,5 mL, livre de RNase. Foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio por mL de Trizol utilizado, agitando vigorosamente por 15 segundos. Foi realizada nova incubação a 30°C por dois a três minutos e posterior centrifugação por 15 minutos a 12000 g a 4°C. Ao sobrenadante, referente ao RNA em solução aquosa, adicionou-se 500  $\mu$ L de álcool isopropílico para precipitação do RNA. A amostra foi novamente homogeneizada, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi descartado, obtendo-se assim o *pellet* correspondente ao RNA, o qual foi lavado adicionando-se etanol 75% em água DEPC<sup>27</sup> (1 mL), ressuspenso em vórtex e centrifugado a 7500 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado, e o *pellet* (RNA) foi eluído em 15  $\mu$ L de água DEPC.

Os parâmetros de concentração e pureza foram avaliados por espectrofotometria<sup>28</sup>, na absorvância de 260 nm e nas razões 260/280 e 260/230 nm, respectivamente, sendo que a razão 260/280 entre 1,8 e 2,0 indicam RNA isento de contaminação proteica e a razão 260/230 maior que 1,8 indicam RNA isento de contaminação com produtos que compõem o trizol. Após a extração do RNA e das análises de concentração e pureza, a integridade da molécula foi avaliada mediante

---

<sup>26</sup> Invitrogen. São Paulo, SP, Brasil

<sup>27</sup> Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA.

<sup>28</sup> NanoDrop 2000®, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA

uso de eletroforese em gel de agarose 1%<sup>29</sup> sob condições denaturantes em formaldeído 2,2 M, usando tampão MOPS<sup>30</sup>. Para a síntese das moléculas de DNA complementar (cDNA) foi utilizado kit comercial<sup>31</sup>, conforme instruções do fabricante.

#### 4.12.3.2 PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

As amplificações dos genes de controle endógeno da hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT)<sup>32</sup>, das IL-1 $\beta$ <sup>33</sup>, IL-6<sup>34</sup>, IL-8<sup>35</sup>, IL-10<sup>36</sup> e do TNF- $\alpha$ <sup>37</sup> foram realizadas seguindo-se as especificações dos ensaios TaqMan® para análise da expressão gênica e as recomendações do sistema de detecção (7500 Fast<sup>38</sup>). A reação da PCR foi composta por 50ng de cDNA (2  $\mu$ L a 25 ng/ $\mu$ L), 10  $\mu$ L de Universal TaqMan® PCR Master mix, 1  $\mu$ L do ensaio TaqMan, composto pelos *primers forward* e *reverse* conjugados a uma sonda fluorescente e água DEPC (7  $\mu$ L) para ajustar o volume da reação para 20  $\mu$ L.

#### 4.12.3.3 Normalização dos dados

O nível relativo de expressão gênica foi calculado pelo método do CT (*cycle threshold*) comparativo para quantificação relativa. Os dados de expressão gênica, para cada gene alvo, foram normalizados a partir de um controle interno (HPRT), obtendo assim o valor de  $\Delta$ CT [ $\Delta$ CT=(Expressão do Gene Alvo) – (Expressão do Controle endógeno)]. Em seguida, os valores foram normalizados em relação a uma amostra de referência [ $\Delta\Delta$ CT= ( $\Delta$ Ct de um tempo experimental) – ( $\Delta$ Ct da amostra de referência)]. Por fim a variação na expressão gênica ou *fold increase* foi expresso pelo valor de  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

<sup>29</sup> Applied Biosystems - São Paulo, SP, Brasil

<sup>30</sup> Applied Biosystems - São Paulo, SP, Brasil

<sup>31</sup> High Capacity cDNA Reverse Transcription kit®, Applied Biosystems - São Paulo, SP, Brasil

<sup>32</sup> TaqMan® Gene Expression Assays - HPRT Código Ec03470222\_m1 Applied Biosystems - SP, Brasil

<sup>33</sup> TaqMan® Gene Expression Assays - IL1 $\beta$  Código Ec04260298\_s1 Applied Biosystems - SP, Brasil

<sup>34</sup> TaqMan® Gene Expression Assays - IL6 Código Ec03468678\_m1 Applied Biosystems - SP, Brasil

<sup>35</sup> TaqMan® Gene Expression Assays - IL8 Código Ec03468860\_m1 Applied Biosystems - SP, Brasil

<sup>36</sup> TaqMan® Gene Expression Assays - IL10 Código Ec03468647\_m1 Applied Biosystems - SP, Brasil

<sup>37</sup> TaqMan® Gene Expression Assays - TNF $\alpha$  Código Ec03467871\_m1 Applied Biosystems - SP, Brasil

<sup>38</sup> Applied Biosystems - São Paulo, SP, Brasil

#### 4.12.4 Procedimentos histológicos

As amostras de casco e 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 com 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<sup>39</sup>. A impregnação e inclusão em parafina<sup>40</sup>, 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 armazenados. Posteriormente, foram efetuados cortes de 5 µm de espessura no micrótomo<sup>41</sup>. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro lapidadas, os quais foram, em seguida, corados com hematoxilina-eosina (HE) (cólon e casco) e ácido periódico-Schiff (PAS) (casco). 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 binocular<sup>42</sup> e sistema fotográfico digital<sup>43</sup>.

#### 4.13 Análises estatísticas e apresentação dos resultados

As variáveis estudadas foram analisadas no programa computacional XLSTAT - Pro e GraphPad Prism 6. Todos os parâmetros foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) e os valores médios comparados pelo teste de Duncan. Para todas as análises realizadas estabeleceu-se o nível de significância igual a  $p < 0,05$ . Os dados obtidos foram apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão da média (EPM), na forma de tabelas e figuras.

---

<sup>39</sup> Reagen - Colombo, PR, Brasil

<sup>40</sup> Paraplast®, Sigma - St. Louis, MO, EUA

<sup>41</sup> Spencer 820, American Optical - New York, NY, EUA

<sup>42</sup> Olympus BX51, Tokyo, Japão

<sup>43</sup> Olympus DP72, Tokyo, Japão

## 5. Resultados

### 5.1 Parâmetros Clínicos

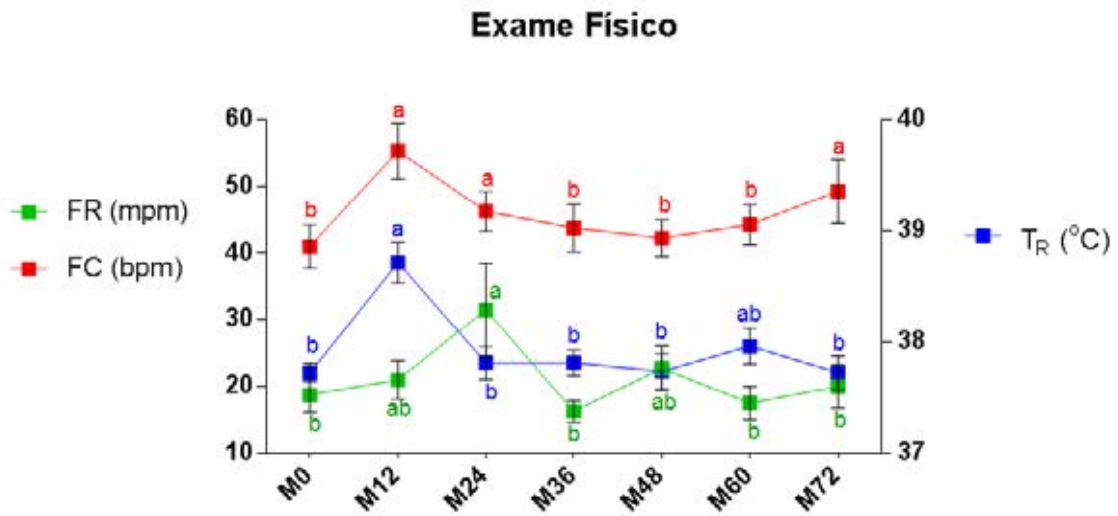
Mediante análise das variáveis clínicas foi possível observar que a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal ( $T_R$ ) (Figura 10) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no decorrer do período experimental (Tabela 1). A FC aumentou 12 horas (M12) após o fim do procedimento cirúrgico ( $p < 0,05$ ), porém retornou aos valores basais com 24 horas (M24), mantendo-se ligeiramente aumentada ( $p > 0,05$ ) até 72 horas (M72). A FR se elevou com 24 horas (M24) ( $p < 0,05$ ), retornando aos valores basais já em 36 horas (M36). A  $T_R$  12 horas (M12) após o término da obstrução cirúrgica apresentou-se aumentada ( $p < 0,05$ ), voltando aos valores basais com 24 horas (M24) e mantendo-se constante até as 72 horas (M72).

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. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós-cirúrgico.

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

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



**Figura 10.** Valores de frequência cardíaca (FR) em batimentos por minuto, frequência respiratória (FR) em movimentos por minuto e temperatura retal ( $T_R$ ) em graus Celsius, obtidos dos animais submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor, considerando M0 antes do procedimento anestésico e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós-cirúrgico. Letras iguais na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 Avaliação Hematológica

As variáveis eritroleucométricas determinadas no decorrer do experimento estão apresentadas nas tabelas 2 e 3. Alterações significativas foram observadas tanto no eritrograma (Tabela 2) quanto no leucograma (Tabela 3) dos animais.

**Tabela 2.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da contagem de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%) e plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue venoso de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento de desobstrução intestinal e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós-cirúrgico.

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

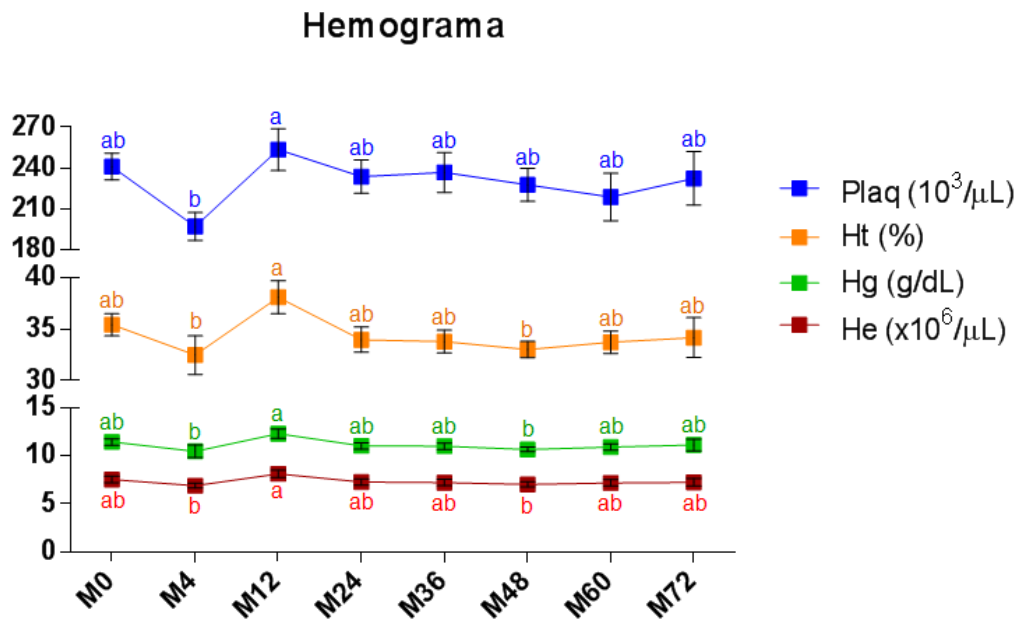
He (hemácias), Hg (hemoglobina), Ht (hematócrito), Plaq (plaquetas). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da contagem de leucócitos totais ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), eosinófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos bastonetes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos segmentados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue venoso de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento de desobstrução intestinal e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós-cirúrgico.

|            | M0                              | M4                               | M12                              | M24                               | M36                               | M48                               | M60                               | M72                               |
|------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Le</b>  | 9,69 $\pm$<br>0,37 <sup>c</sup> | 9,79 $\pm$<br>0,57 <sup>c</sup>  | 16,50 $\pm$<br>1,27 <sup>a</sup> | 13,70 $\pm$<br>1,01 <sup>ab</sup> | 12,54 $\pm$<br>1,15 <sup>bc</sup> | 12,31 $\pm$<br>1,56 <sup>bc</sup> | 12,08 $\pm$<br>1,49 <sup>bc</sup> | 10,79 $\pm$<br>1,10 <sup>bc</sup> |
| <b>Bas</b> | 0,00 $\pm$<br>0,00 <sup>a</sup> | 0,02 $\pm$<br>0,02 <sup>a</sup>  | 0,00 $\pm$<br>0,00 <sup>a</sup>  | 0,00 $\pm$<br>0,00 <sup>a</sup>   | 0,00 $\pm$<br>0,00 <sup>a</sup>   | 0,03 $\pm$<br>0,02 <sup>a</sup>   | 0,04 $\pm$<br>0,03 <sup>a</sup>   | 0,04 $\pm$<br>0,02 <sup>a</sup>   |
| <b>Eos</b> | 0,26 $\pm$<br>0,06 <sup>a</sup> | 0,15 $\pm$<br>0,02 <sup>ab</sup> | 0,05 $\pm$<br>0,05 <sup>b</sup>  | 0,02 $\pm$<br>0,02 <sup>b</sup>   | 0,05 $\pm$<br>0,03 <sup>b</sup>   | 0,28 $\pm$<br>0,08 <sup>a</sup>   | 0,33 $\pm$<br>0,11 <sup>a</sup>   | 0,30 $\pm$<br>0,10 <sup>a</sup>   |
| <b>NB</b>  | 0,00 $\pm$<br>0,00 <sup>c</sup> | 0,03 $\pm$<br>0,02 <sup>bc</sup> | 0,85 $\pm$<br>0,19 <sup>a</sup>  | 0,23 $\pm$<br>0,04 <sup>b</sup>   | 0,00 $\pm$<br>0,00 <sup>c</sup>   | 0,00 $\pm$<br>0,00 <sup>c</sup>   | 0,05 $\pm$<br>0,03 <sup>bc</sup>  | 0,09 $\pm$<br>0,04 <sup>bc</sup>  |
| <b>NS</b>  | 5,36 $\pm$<br>0,49 <sup>d</sup> | 6,82 $\pm$<br>0,57 <sup>cd</sup> | 13,00 $\pm$<br>1,12 <sup>a</sup> | 10,79 $\pm$<br>1,17 <sup>ab</sup> | 9,58 $\pm$<br>1,06 <sup>bc</sup>  | 8,60 $\pm$<br>1,37 <sup>bcd</sup> | 8,71 $\pm$<br>1,25 <sup>bc</sup>  | 8,17 $\pm$<br>1,07 <sup>bcd</sup> |
| <b>Ln</b>  | 3,96 $\pm$<br>0,47 <sup>a</sup> | 2,67 $\pm$<br>0,23 <sup>b</sup>  | 2,44 $\pm$<br>0,40 <sup>b</sup>  | 2,47 $\pm$<br>0,38 <sup>b</sup>   | 2,76 $\pm$<br>0,29 <sup>b</sup>   | 3,22 $\pm$<br>0,46 <sup>ab</sup>  | 2,73 $\pm$<br>0,35 <sup>b</sup>   | 2,93 $\pm$<br>0,43 <sup>ab</sup>  |
| <b>Mo</b>  | 0,14 $\pm$<br>0,03 <sup>a</sup> | 0,09 $\pm$<br>0,03 <sup>a</sup>  | 0,15 $\pm$<br>0,04 <sup>a</sup>  | 0,19 $\pm$<br>0,07 <sup>a</sup>   | 0,14 $\pm$<br>0,02 <sup>a</sup>   | 0,18 $\pm$<br>0,05 <sup>a</sup>   | 0,21 $\pm$<br>0,05 <sup>a</sup>   | 0,17 $\pm$<br>0,04 <sup>a</sup>   |

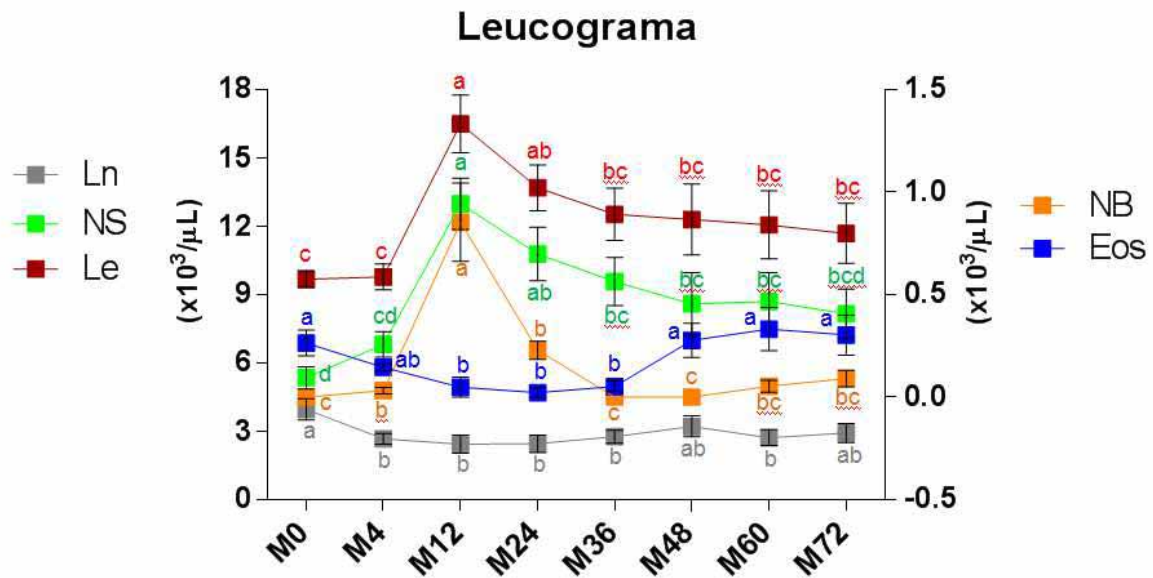
Le (leucócitos totais), Bas (basófilos), Eos (eosinófilos), NB (neutrófilos bastonetes), NS (neutrófilos segmentados), Ln (linfócitos), Mo (monócitos). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Na porção eritrocitária do hemograma (Figura 11) não se observou diferenças significativas ( $p>0,05$ ), porém verificou-se diminuição discreta de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaqueta, quatro horas após a obstrução intestinal (M4). Estas variáveis após 12 horas da desobstrução (M12), apresentaram aumento ( $p<0,05$ ), retornando aos valores basais em M24. Com 48 horas de desobstrução (M48), os valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito obtiveram seus valores mais baixos, diferenciando significativamente dos valores de M12, porém não diferiram dos valores basais.



**Figura 11.** Valores de contagem de hemácias (He) ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobina (Hg) (g/dL), hematócrito (Ht) (%) e plaquetas (Pla<sub>q</sub>) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue venoso de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós-cirúrgico. Letras iguais na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Os valores obtidos para o leucograma no período de recuperação indicam aumento de leucócitos em M12 e M24 ( $p < 0,05$ ). A resposta leucocitária diminuiu a partir de M36, mantendo-se acima dos valores basais, porém o aumento não foi significativo ( $p > 0,05$ ). Não ocorreu alterações para os valores de basófilos e monócitos em nenhum dos momentos estudados. Em relação aos eosinófilos, observou-se diminuição dos valores entre M12 e M36, com os demais momentos não diferindo do basal. Quanto aos bastonetes, estes aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) em M12 e M24, enquanto nos demais momentos se mantiveram inalterados em relação ao basal. Os neutrófilos segmentados aumentaram ( $p < 0,05$ ) entre M12 e M36, retornando aos valores basais em M48. Aumento discreto, ( $p < 0,05$ ) de segmentados foi registrado em M60, porém em M72 os valores retornaram aqueles registrados no basal. Quanto aos linfócitos, registrou-se diminuição ( $p < 0,05$ ) dos valores entre M4 e M36, assim como em M60, com os demais momentos mantendo-se próximo ao basal (Figura 12).



**Figura 12.** Valores da contagem de leucócitos totais (Le) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), eosinófilos (Eos) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos bastonetes (NB) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos segmentados (NS) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), linfócitos (Ln) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e monócitos (Mo) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue venoso de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M12, M24, M36, M48, M60 e M72 como pós-cirúrgico. Letras iguais na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

### 5.3 Avaliação do Líquido Peritoneal

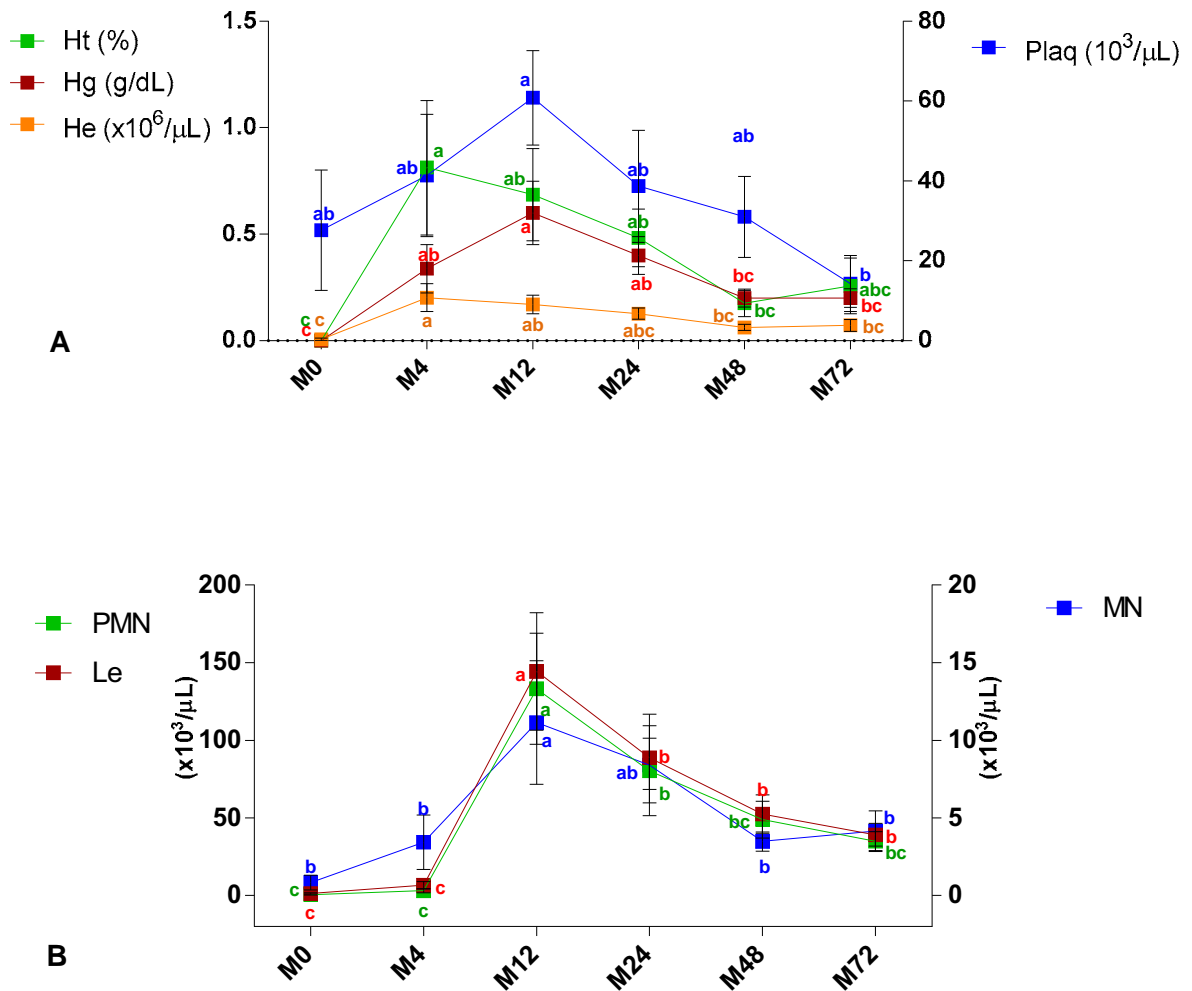
Na análise eritrocitária e leucocitária do líquido peritoneal foram observadas alterações significativas ( $p < 0,05$ ) dos valores mensurados no decorrer do período experimental (Tabela 4). Foi observado aumento estatístico dos valores das hemácias, hemoglobina e hematócrito, após quatro horas de obstrução (M4), dos quais os valores de hemácias e hematócrito se mantiveram elevados por 12 horas. A hemoglobina só retornou ao basal após 48 horas de desobstrução (M48) (Figura 13A). Já na porção leucocitária, encontrou-se aumento de leucócitos após 12 horas da desobstrução (M12). Esses valores mantiveram-se acima dos observados no basal até 72 horas (M72). Também, foi encontrado aumento significativo de polimorfonucleados em M12, o qual permaneceu até 24 horas. Os valores de mononucleares mantiveram-se inalterados em quase todo o período experimental, exceto em M12 quando registrou-se aumento marcante ( $p < 0,05$ ) em relação ao basal (Figura 13B).

**Tabela 4.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da contagem de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), leucócitos totais ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), polimorfonucleados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e mononucleados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no líquido peritoneal de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M12, M24, M48 e M72 como pós-cirúrgico.

|             | <b>M0</b>                          | <b>M4</b>                          | <b>M12</b>                         | <b>M24</b>                         | <b>M48</b>                         | <b>M72</b>                        |
|-------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>He</b>   | 0,01 $\pm$<br>0,01 <sup>c</sup>    | 0,20 $\pm$<br>0,07 <sup>a</sup>    | 0,17 $\pm$<br>0,04 <sup>ab</sup>   | 0,13 $\pm$<br>0,03 <sup>abc</sup>  | 0,06 $\pm$<br>0,01 <sup>bc</sup>   | 0,07 $\pm$<br>0,03 <sup>bc</sup>  |
| <b>Hg</b>   | 0,00 $\pm$<br>0,00 <sup>c</sup>    | 0,34 $\pm$<br>0,11 <sup>ab</sup>   | 0,60 $\pm$<br>0,15 <sup>a</sup>    | 0,40 $\pm$<br>0,09 <sup>ab</sup>   | 0,20 $\pm$<br>0,04 <sup>bc</sup>   | 0,20 $\pm$<br>0,04 <sup>bc</sup>  |
| <b>Ht</b>   | 0,00 $\pm$<br>0,00 <sup>c</sup>    | 0,81 $\pm$<br>0,32 <sup>a</sup>    | 0,69 $\pm$<br>0,22 <sup>ab</sup>   | 0,48 $\pm$<br>0,14 <sup>abc</sup>  | 0,18 $\pm$<br>0,06 <sup>bc</sup>   | 0,26 $\pm$<br>0,13 <sup>abc</sup> |
| <b>Plaq</b> | 27,67 $\pm$<br>15,11 <sup>ab</sup> | 41,38 $\pm$<br>15,34 <sup>ab</sup> | 60,86 $\pm$<br>11,79 <sup>a</sup>  | 38,67 $\pm$<br>14,02 <sup>ab</sup> | 31,00 $\pm$<br>10,14 <sup>ab</sup> | 14,29 $\pm$<br>7,00 <sup>b</sup>  |
| <b>Le</b>   | 1,31 $\pm$<br>0,33 <sup>c</sup>    | 6,65 $\pm$<br>2,37 <sup>c</sup>    | 144,31 $\pm$<br>37,85 <sup>a</sup> | 88,85 $\pm$<br>20,44 <sup>b</sup>  | 52,44 $\pm$<br>12,30 <sup>b</sup>  | 39,21 $\pm$<br>7,19 <sup>b</sup>  |
| <b>Poli</b> | 0,55 $\pm$<br>0,14 <sup>c</sup>    | 3,21 $\pm$<br>1,24 <sup>c</sup>    | 133,18 $\pm$<br>35,80 <sup>a</sup> | 80,44 $\pm$<br>20,86 <sup>b</sup>  | 48,95 $\pm$<br>11,87 <sup>bc</sup> | 35,07 $\pm$<br>6,08 <sup>bc</sup> |
| <b>Mono</b> | 0,84 $\pm$<br>0,47 <sup>b</sup>    | 3,44 $\pm$<br>1,76 <sup>b</sup>    | 11,14 $\pm$<br>3,97 <sup>a</sup>   | 8,41 $\pm$<br>3,28 <sup>ab</sup>   | 3,49 $\pm$<br>0,61 <sup>b</sup>    | 4,15 $\pm$<br>1,31 <sup>b</sup>   |

He (hemácias), Hg (hemoglobina), Ht (hematócrito), Plaq (plaquetas), Le (leucócitos totais), Poli (polimorfonucleados) e Mono (mononucleados). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

## Líquido Peritoneal



**Figura 13.** Avaliação do líquido peritoneal de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. (A) Valores da contagem de hemácias (He) ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobina (Hg) (g/dL), hematócrito (Ht) (%) e plaquetas (Pla) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). (B) Valores da contagem de leucócitos totais (Le) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), polimorfonucleados (PMN) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e mononucleados (MN) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M12, M24, M48 e M72 como pós-cirúrgico. Letras iguais na linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

#### 5.4 ELISA sanduíche

Os resultados obtidos no sangue (Tabela 5) e líquido peritoneal (Tabela 6) demonstram que não houve alterações nos níveis séricos das diferentes citocinas avaliadas, porém foi observado aumento das concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no líquido peritoneal em M4 (Figura 14A e 15A).

**Tabela 5.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da concentração proteica (pg/mL) das interleucinas -1 $\beta$ , -6 e TNF- $\alpha$  no sangue venoso de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico.

|                                | M0                             | M4                             | M72                            |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | 0,013 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup> | 0,013 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup> | 0,012 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup> |
| <b>IL-6</b>                    | 0,069 $\pm$ 0,038 <sup>a</sup> | 0,048 $\pm$ 0,019 <sup>a</sup> | 0,052 $\pm$ 0,018 <sup>a</sup> |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 0,018 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup> | 0,016 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup> | 0,013 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup> |

IL (Interleucina), TNF (Fator de Necrose Tumoral). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 6.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da concentração proteica (pg/mL) das interleucinas -1 $\beta$ , -6 e TNF- $\alpha$  no líquido peritoneal de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico.

|                                | M0                             | M4                              | M72                             |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | 0,008 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup> | 0,027 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>  | 0,011 $\pm$ 0,003 <sup>ab</sup> |
| <b>IL-6</b>                    | 0,032 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup> | 13,978 $\pm$ 4,605 <sup>a</sup> | 0,167 $\pm$ 0,089 <sup>b</sup>  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 0,033 $\pm$ 0,009 <sup>b</sup> | 0,525 $\pm$ 0,228 <sup>a</sup>  | 0,018 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup>  |

IL (Interleucina), TNF (Fator de Necrose Tumoral). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

#### 5.5 qRT-PCR em tempo real

Nos valores encontrados para expressão gênica das citocinas em leucócitos do sangue periférico, não foram observadas alterações para os diferentes genes estudados (Tabela 7 e Figura 14B).

**Tabela 7.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do aumento relativo da expressão gênica das interleucinas -1 $\beta$ , -6, -8, -10 e TNF- $\alpha$  em leucócitos do sangue venosos periférico de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico.

|                                | <b>M0</b>                       | <b>M4</b>                      | <b>M72</b>                     |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | 0,298 $\pm$ 0,132 <sup>a</sup>  | 0,881 $\pm$ 0,447 <sup>a</sup> | 0,564 $\pm$ 0,333 <sup>a</sup> |
| <b>IL-6</b>                    | 0,299 $\pm$ 0,124 <sup>a</sup>  | 0,442 $\pm$ 0,079 <sup>a</sup> | 0,231 $\pm$ 0,101 <sup>a</sup> |
| <b>IL-8</b>                    | 0,218 $\pm$ 0,133 <sup>a</sup>  | 0,079 $\pm$ 0,012 <sup>a</sup> | 0,367 $\pm$ 0,096 <sup>a</sup> |
| <b>IL-10</b>                   | 0,371 $\pm$ 0,130 <sup>ab</sup> | 0,645 $\pm$ 0,140 <sup>a</sup> | 0,155 $\pm$ 0,038 <sup>b</sup> |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 0,453 $\pm$ 0,103 <sup>a</sup>  | 0,429 $\pm$ 0,095 <sup>a</sup> | 0,420 $\pm$ 0,132 <sup>a</sup> |

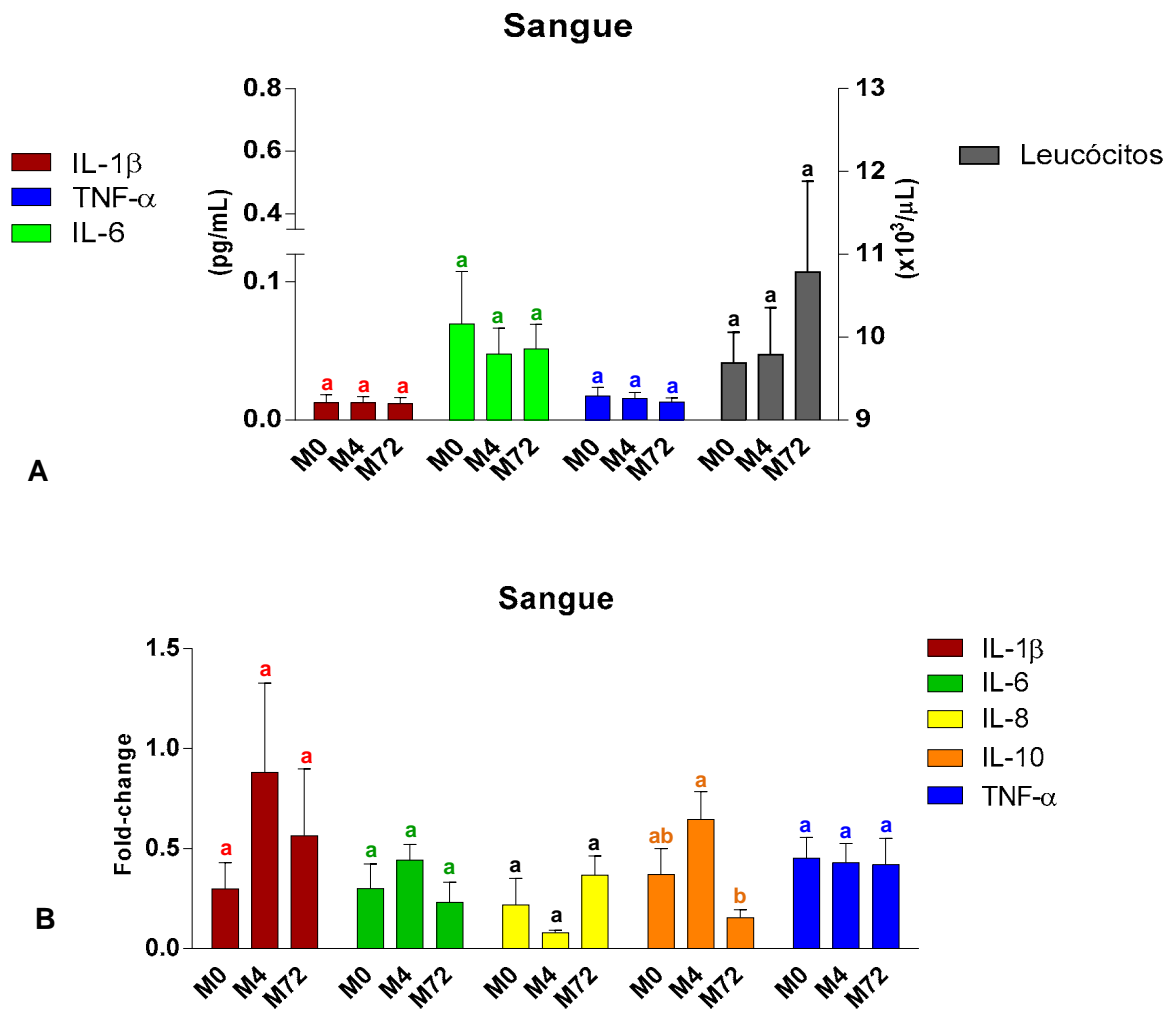
IL (Interleucina), TNF (Fator de Necrose Tumoral). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Na avaliação do líquido peritoneal, houve aumento da expressão gênica de todas as citocinas em M4 (Tabela 8), no qual se destacou a IL-8, com um aumento superior a 11.000 vezes (Figura 15B).

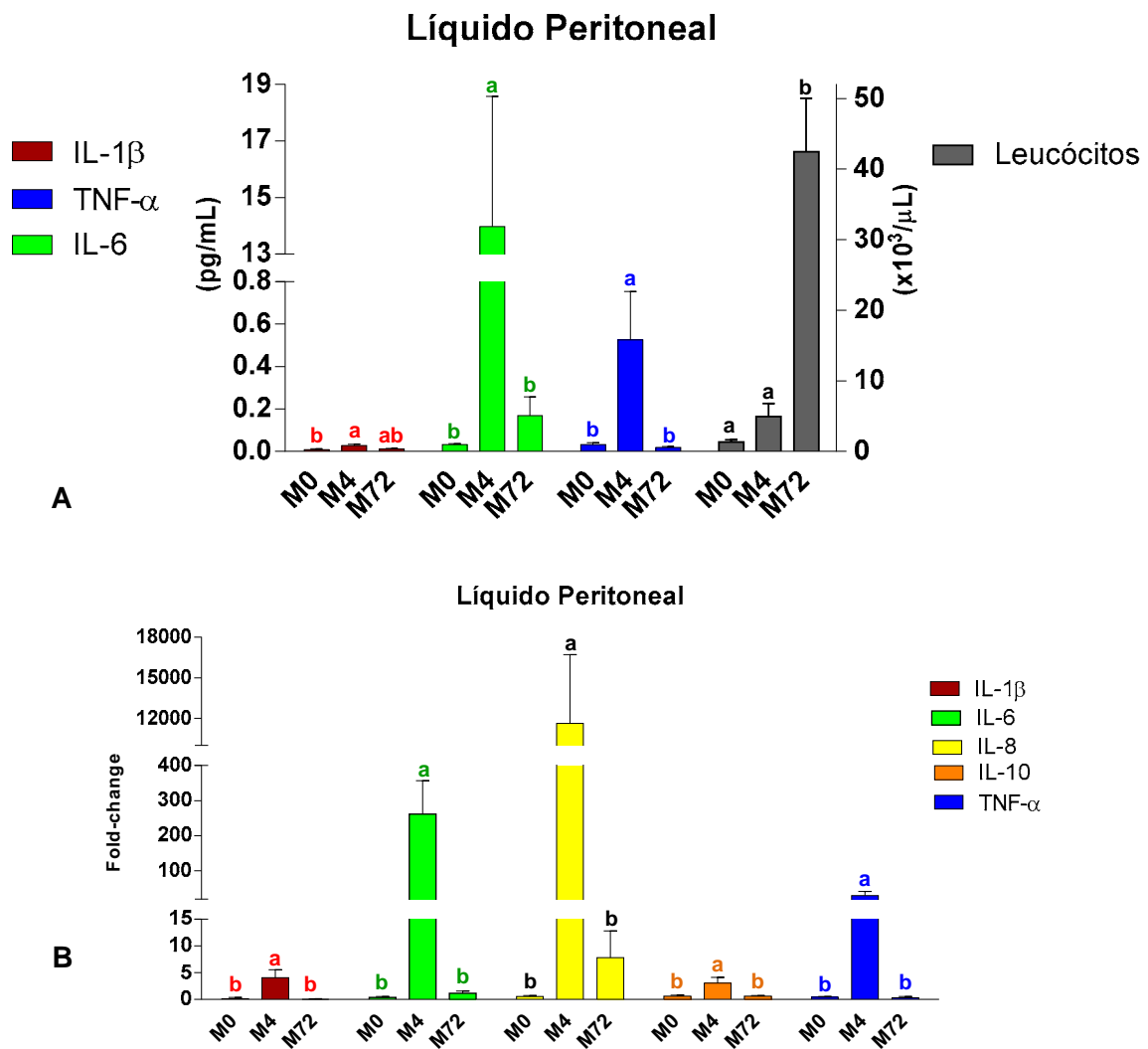
**Tabela 8.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do aumento relativo da expressão gênica das interleucinas -1 $\beta$ , -6, -8, -10 e TNF- $\alpha$  de leucócitos do líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico.

|                                | <b>M0</b>                      | <b>M4</b>                             | <b>M72</b>                     |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | 0,201 $\pm$ 0,199 <sup>b</sup> | 4,042 $\pm$ 1,521 <sup>a</sup>        | 0,078 $\pm$ 0,063 <sup>b</sup> |
| <b>IL-6</b>                    | 0,411 $\pm$ 0,160 <sup>b</sup> | 261,486 $\pm$ 95,000 <sup>a</sup>     | 1,166 $\pm$ 0,455 <sup>b</sup> |
| <b>IL-8</b>                    | 0,558 $\pm$ 0,222 <sup>b</sup> | 11615,770 $\pm$ 5096,000 <sup>a</sup> | 7,861 $\pm$ 4,941 <sup>b</sup> |
| <b>IL-10</b>                   | 0,642 $\pm$ 0,156 <sup>b</sup> | 3,042 $\pm$ 1,120 <sup>a</sup>        | 0,649 $\pm$ 0,089 <sup>b</sup> |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 0,444 $\pm$ 0,150 <sup>b</sup> | 28,620 $\pm$ 11,45 <sup>a</sup>       | 0,361 $\pm$ 0,209 <sup>b</sup> |

IL (Interleucina), TNF (Fator de Necrose Tumoral). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).



**Figura 14.** Comparação das citocinas entre os diferentes métodos de análises. (A) Valores obtidos no ELISA para as IL-1 $\beta$  e IL-6 e para o TNF- $\alpha$  no sangue. (B) Valores de IL 1 $\beta$ , 6, 8, 10 e TNF- $\alpha$  obtidos com PCR em tempo real no sangue. Todas as amostras obtidas de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico. Letras iguais dentro do mesmo gene não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).



**Figura 15.** Comparação das citocinas entre os diferentes métodos de análises. (A) Valores obtidos no ELISA para IL-1 $\beta$  e IL-6 e para o TNF- $\alpha$  no líquido peritoneal. (B) Valores de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  obtidos com PCR em tempo real no líquido peritoneal. Todas as amostras obtidas de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico. Letras iguais dentro do mesmo gene não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Os valores encontrados para avaliação da expressão gênica do cólon menor, nas três regiões de colheita (cólon oral, cólon bola e cólon aboral), estão descritas nas Tabelas 9, 10 e 11, respectivamente. Na região oral à porção obstruída, apenas a expressão do TNF- $\alpha$  aumentou significativamente em M4 (Figura 16A). Na região onde a bola permaneceu em contato durante a obstrução, não houve diferença na expressão gênica das diferentes citocinas (Figura 16B). Ao avaliar a região aboral à

obstrução, pôde ser observado aumento da IL-1 $\beta$  em M4 e redução da expressão gênica do TNF- $\alpha$  em M4 e M72 (Figura 16C).

**Tabela 9.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  da região oral à obstrução intraluminal do cólon menor de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico.

|               | M0                             | M4                             | M72                            |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| IL-1 $\beta$  | 0,338 $\pm$ 0,124 <sup>a</sup> | 0,685 $\pm$ 0,274 <sup>a</sup> | 0,372 $\pm$ 0,091 <sup>a</sup> |
| IL-6          | 0,202 $\pm$ 0,199 <sup>a</sup> | 0,035 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup> | 0,005 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup> |
| IL-8          | 0,231 $\pm$ 0,130 <sup>a</sup> | 0,133 $\pm$ 0,038 <sup>a</sup> | 0,066 $\pm$ 0,027 <sup>a</sup> |
| IL-10         | 0,429 $\pm$ 0,134 <sup>a</sup> | 0,482 $\pm$ 0,113 <sup>a</sup> | 0,213 $\pm$ 0,059 <sup>a</sup> |
| TNF- $\alpha$ | 0,828 $\pm$ 0,106 <sup>b</sup> | 1,632 $\pm$ 0,380 <sup>a</sup> | 0,373 $\pm$ 0,201 <sup>b</sup> |

IL (Interleucina), TNF (Fator de Necrose Tumoral). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 10.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  da região obstruída do cólon menor de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico.

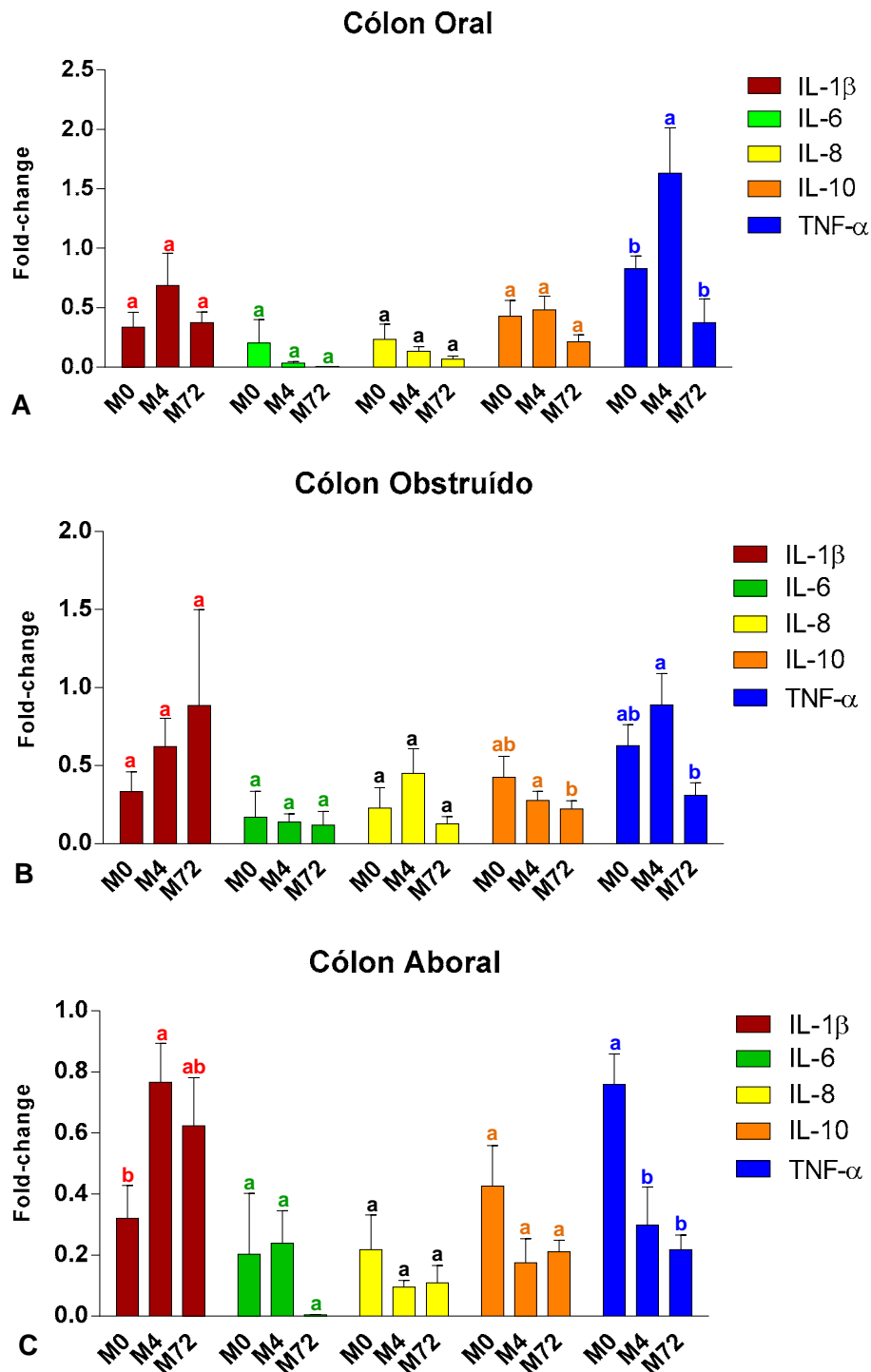
|               | M0                              | M4                             | M72                            |
|---------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| IL-1 $\beta$  | 0,335 $\pm$ 0,124 <sup>a</sup>  | 0,623 $\pm$ 0,181 <sup>a</sup> | 0,884 $\pm$ 0,615 <sup>a</sup> |
| IL-6          | 0,169 $\pm$ 0,166 <sup>a</sup>  | 0,137 $\pm$ 0,054 <sup>a</sup> | 0,119 $\pm$ 0,087 <sup>a</sup> |
| IL-8          | 0,228 $\pm$ 0,131 <sup>a</sup>  | 0,451 $\pm$ 0,157 <sup>a</sup> | 0,128 $\pm$ 0,046 <sup>a</sup> |
| IL-10         | 0,426 $\pm$ 0,133 <sup>ab</sup> | 0,278 $\pm$ 0,057 <sup>a</sup> | 0,222 $\pm$ 0,055 <sup>b</sup> |
| TNF- $\alpha$ | 0,628 $\pm$ 0,136 <sup>ab</sup> | 0,889 $\pm$ 0,201 <sup>a</sup> | 0,310 $\pm$ 0,079 <sup>b</sup> |

IL (Interleucina), TNF (Fator de Necrose Tumoral). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 11.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  da região aboral à obstrução intraluminal do cólon menor de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico.

|               | M0                             | M4                             | M72                             |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| IL-1 $\beta$  | 0,320 $\pm$ 0,109 <sup>b</sup> | 0,766 $\pm$ 0,128 <sup>a</sup> | 0,623 $\pm$ 0,159 <sup>ab</sup> |
| IL-6          | 0,203 $\pm$ 0,199 <sup>a</sup> | 0,239 $\pm$ 0,106 <sup>a</sup> | 0,004 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>  |
| IL-8          | 0,218 $\pm$ 0,114 <sup>a</sup> | 0,095 $\pm$ 0,023 <sup>a</sup> | 0,109 $\pm$ 0,057 <sup>a</sup>  |
| IL-10         | 0,426 $\pm$ 0,133 <sup>a</sup> | 0,175 $\pm$ 0,079 <sup>a</sup> | 0,211 $\pm$ 0,038 <sup>a</sup>  |
| TNF- $\alpha$ | 0,759 $\pm$ 0,101 <sup>a</sup> | 0,298 $\pm$ 0,125 <sup>b</sup> | 0,218 $\pm$ 0,049 <sup>b</sup>  |

IL (Interleucina), TNF (Fator de Necrose Tumoral). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).



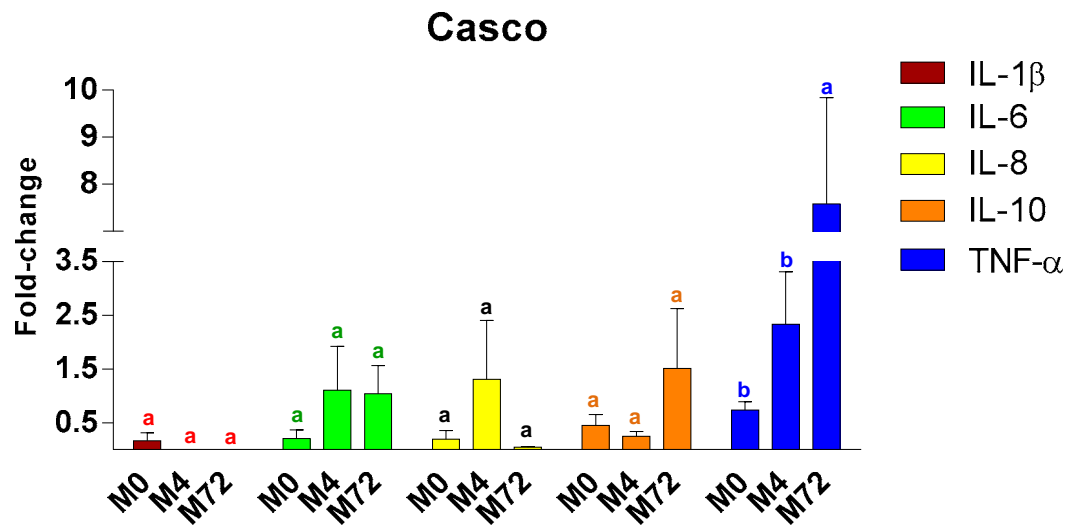
**Figura 16.** Comparação das citocinas entre as diferentes regiões do cólon menor obtidas de equinos submetidos a obstrução intraluminal. (A) Valores de IL -1 $\beta$ , -6, -8, -10 e TNF $\alpha$  da região oral à obstrução. (B) Valores da região em que a bola de látex permaneceu durante a obstrução. (C) Valores da região aboral à obstrução. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico. Letras iguais dentro do mesmo gene não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Na avaliação da expressão gênica do tecido dérmico e epidérmico podal observou-se apenas o aumento tardio do TNF- $\alpha$  em M72 (Tabela 12 e Figura 17).

**Tabela 12.** Médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  do tecido dérmico e epidérmico podal de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor de equinos. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico.

|               | M0                             | M4                             | M72                            |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| IL-1 $\beta$  | 0,170 $\pm$ 0,141 <sup>a</sup> | 0,003 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup> | 0,002 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup> |
| IL-6          | 0,206 $\pm$ 0,161 <sup>a</sup> | 1,107 $\pm$ 0,822 <sup>a</sup> | 1,045 $\pm$ 0,521 <sup>a</sup> |
| IL-8          | 0,195 $\pm$ 0,161 <sup>a</sup> | 1,308 $\pm$ 1,100 <sup>a</sup> | 0,047 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup> |
| IL-10         | 0,454 $\pm$ 0,202 <sup>a</sup> | 0,251 $\pm$ 0,085 <sup>a</sup> | 1,510 $\pm$ 1,116 <sup>a</sup> |
| TNF- $\alpha$ | 0,733 $\pm$ 0,160 <sup>b</sup> | 2,336 $\pm$ 0,979 <sup>b</sup> | 7,577 $\pm$ 2,258 <sup>a</sup> |

IL (Interleucina), TNF (Fator de Necrose Tumoral). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).



**Figura 17.** Valores de IL 1 $\beta$ , 6, 8, 10 e TNF $\alpha$  do tecido dérmico e epidérmico do casco de equinos submetidos a obstrução intraluminal do cólon menor. Considera-se M0 antes do procedimento anestésico, M4 o momento da desobstrução intestinal e M72 como pós-cirúrgico. Letras iguais dentro do mesmo gene não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

## **5.6 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 da bola, observou-se que a parede intestinal estava delgada e friável. Quarenta e cinco minutos após a descompressão, a serosa dessa região ainda se apresentava congesta e a parede intestinal estava espessa.

Nas regiões oral e aboral à obstrução 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.

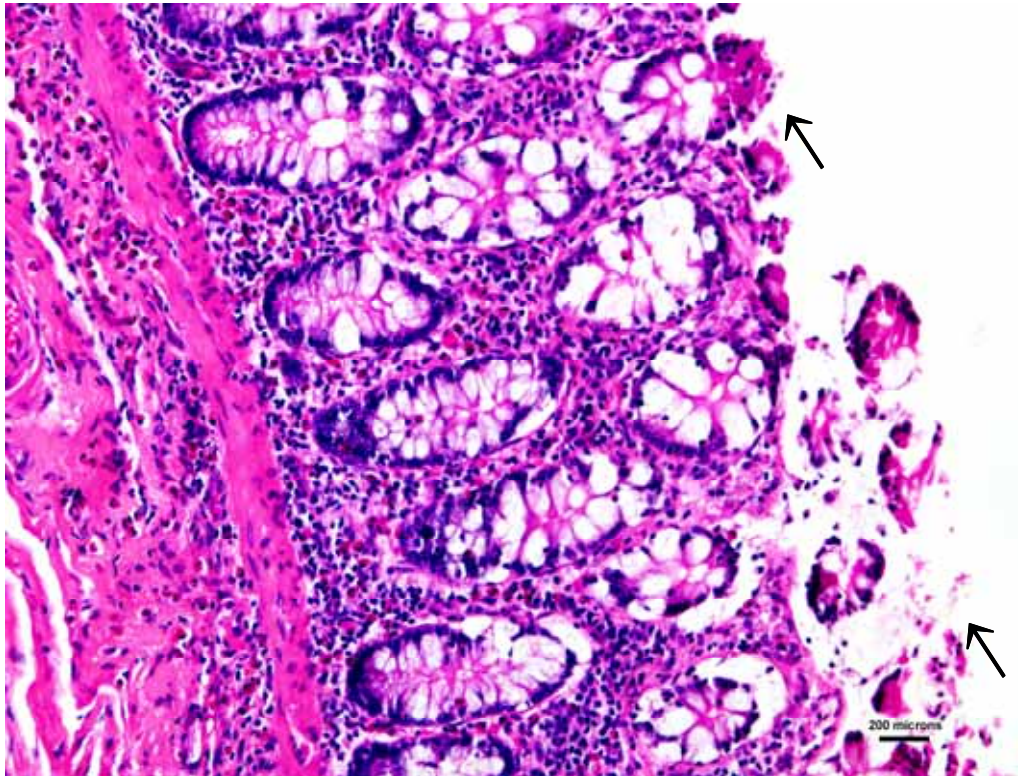
## **5.7 Análise Histológica**

### **5.7.1 Cólon menor**

Foi realizada avaliação histológica das camadas intestinais e, em M0 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 da obstrução, tanto a mucosa como o epitélio perderam sua integridade, mas mantiveram a infiltração eosinofílica (Figura 18).

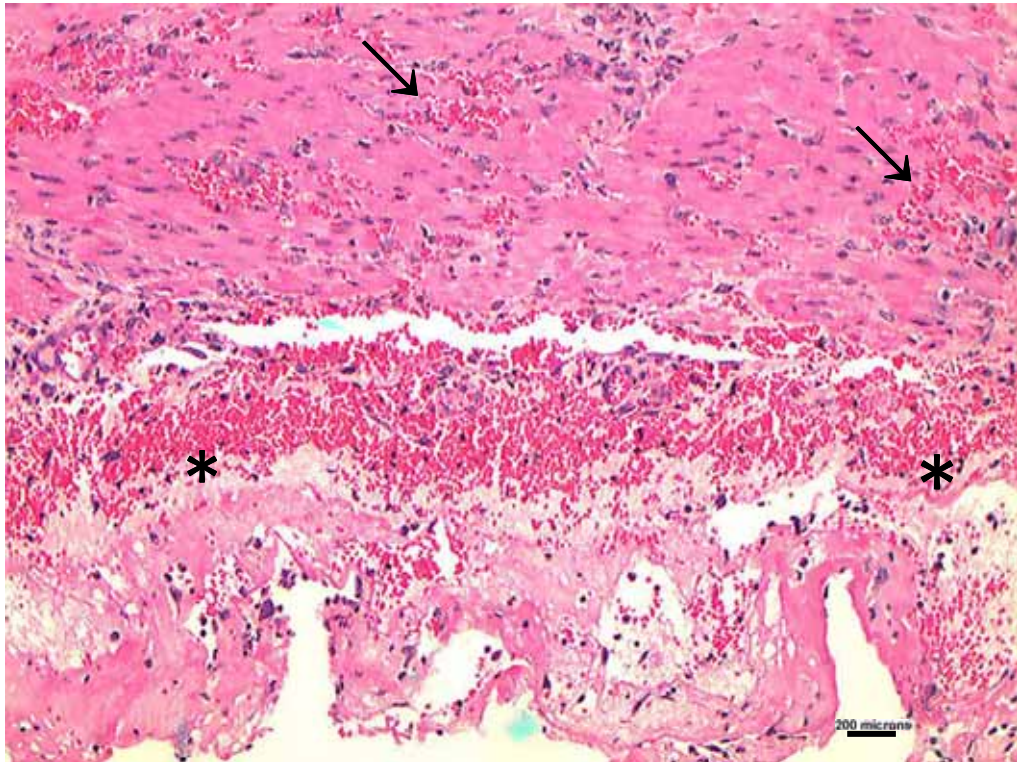
Na submucosa, tanto na porção oral como aboral, se observou a presença de infiltrado inflamatório discreto, composto por macrófagos, plasmócitos e eosinófilos, distribuídos de maneira difusa. Porém, apenas na porção oral, foi encontrado infiltrado moderado de linfócitos, com distribuição difusa, além de edema difuso e discreto. Na porção obstruída foi observado apenas infiltrado moderado de eosinófilos, com distribuição difusa.



**Figura 18.** Fotomicrografia ilustrando a camada mucosa do cólon 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 (seta). Hematoxilina-Eosina, obj 20x.

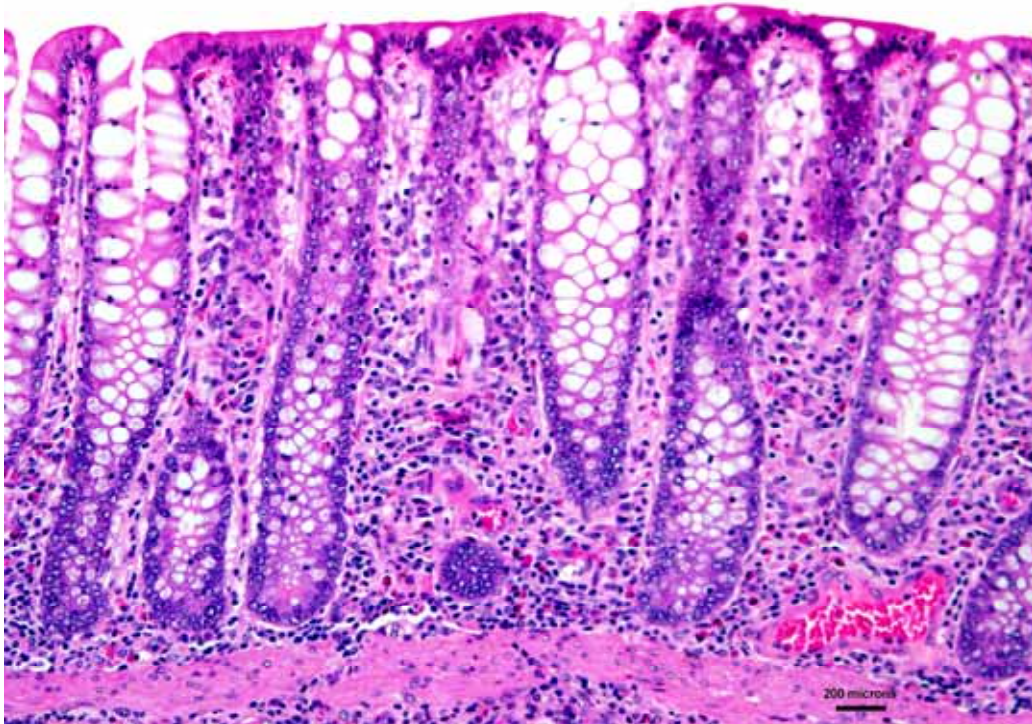
Na camada muscular e no tecido conjuntivo entre essas camadas da porção oral e aboral, foi observado infiltrado inflamatório discreto, composto de neutrófilos, distribuídos de maneira difusa. Na porção da obstrução, nenhuma alteração foi encontrada.

Já na camada serosa oral e aboral, ambas apresentaram infiltrado inflamatório moderado, composto por neutrófilos, distribuídos de maneira multifocal. Contudo, apenas na porção oral o infiltrado era composto por plasmócitos e macrófagos. Na porção onde a bola foi alocada, observou-se a presença de infiltrado inflamatório moderado, de distribuição multifocal, composto por neutrófilos (Figura 19).



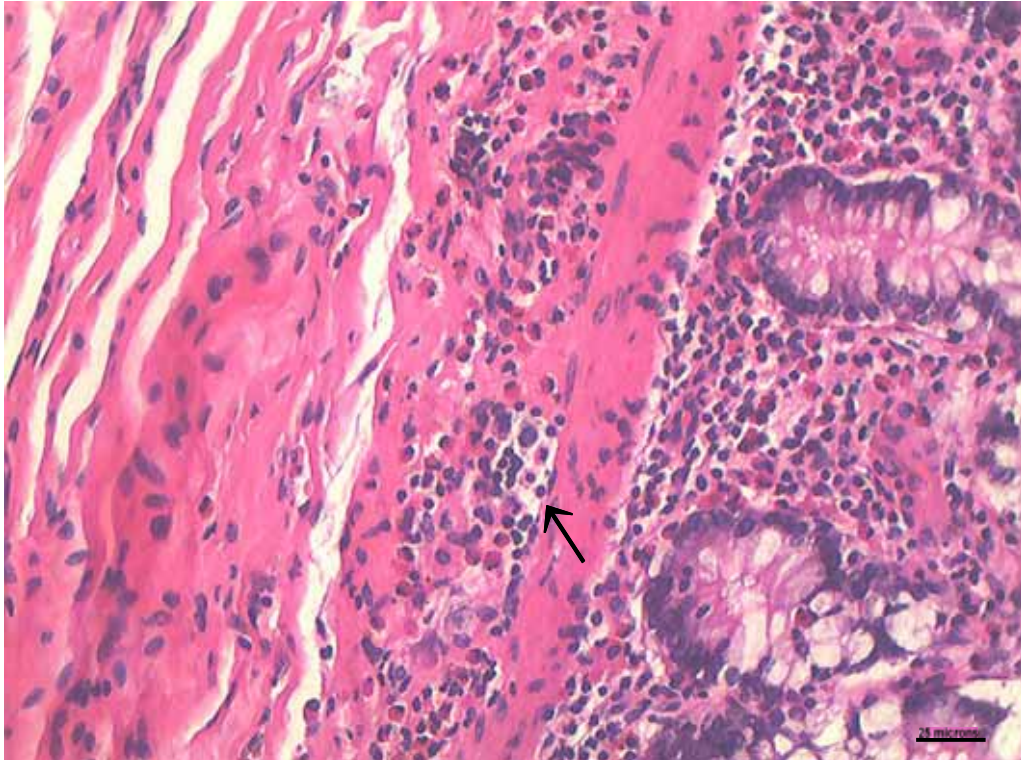
**Figura 19.** Fotomicrografia ilustrando as camadas muscular e serosa do cólon menor de equino submetido à obstrução intraluminal após quatro horas de indução (porção obstruída). Observa-se hemorragia na camada muscular (setas) e hemorragia e edema na camada serosa (asteriscos). Hematoxilina-Eosina, obj 20x.

Em M72, as porções do cólon oral e aboral apresentaram o epitélio e a mucosa íntegros, com presença de eosinófilos. Na porção da obstrução, 50% dos animais apresentaram a mucosa e o epitélio íntegros (Figura 20), porém nos outros animais foram observados perda da integridade ou achatamento de mucosa, ou ainda, destruição de epitélio.



**Figura 20.** Fotomicrografia ilustrando a camadas mucosa do cólon menor de equino submetido à obstrução intraluminal após 72 horas de desobstrução (porção 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 por macrófagos e eosinófilos, distribuídos de maneira difusa. Na porção obstruída, o infiltrado era composto por macrófagos, linfócitos e eosinófilos, também com distribuição difusa (Figura 21).



**Figura 21.** Fotomicrografia ilustrando a camada submucosa do cólon 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 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, apenas observou-se a presença do infiltrado composto por neutrófilos, entre as fibras musculares.

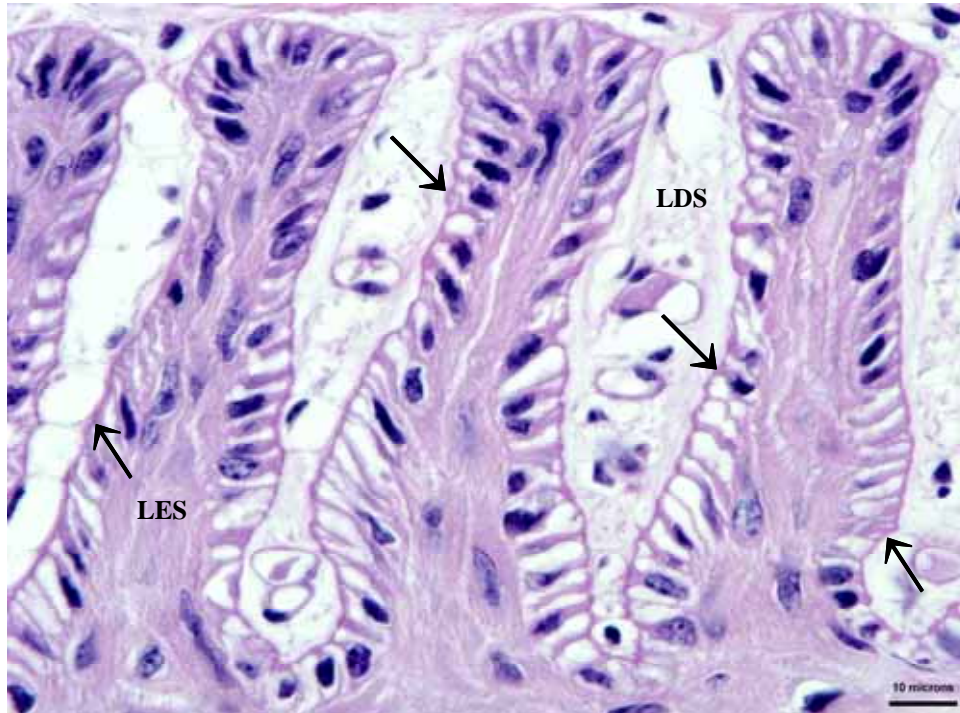
Já na camada serosa oral e aboral, ambas apresentavam infiltrado inflamatório discreto, composto por neutrófilos e macrófagos distribuídos de maneira difusa. Na porção obstruída, observou-se a presença de infiltrado inflamatório discreto e distribuição multifocal, composto por neutrófilos e macrófagos,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

### 5.7.2 Casco

Na análise histológica dos tecidos dérmicos e epidérmicos do casco observou-se que em M0, as lâminas epidérmicas primárias (LEPs) e as lâminas dérmicas primárias (LDPs) se apresentavam intactas (Figura 22). Também se observou que as extremidades das lâminas epidérmicas secundárias (LES) possuíam formato arredondado e o seu eixo longitudinal estava posicionado, em geral, em direção à falange distal. A membrana basal (MB) também apresentava-se intacta e claramente delineada, sem interrupção (Figura 23).



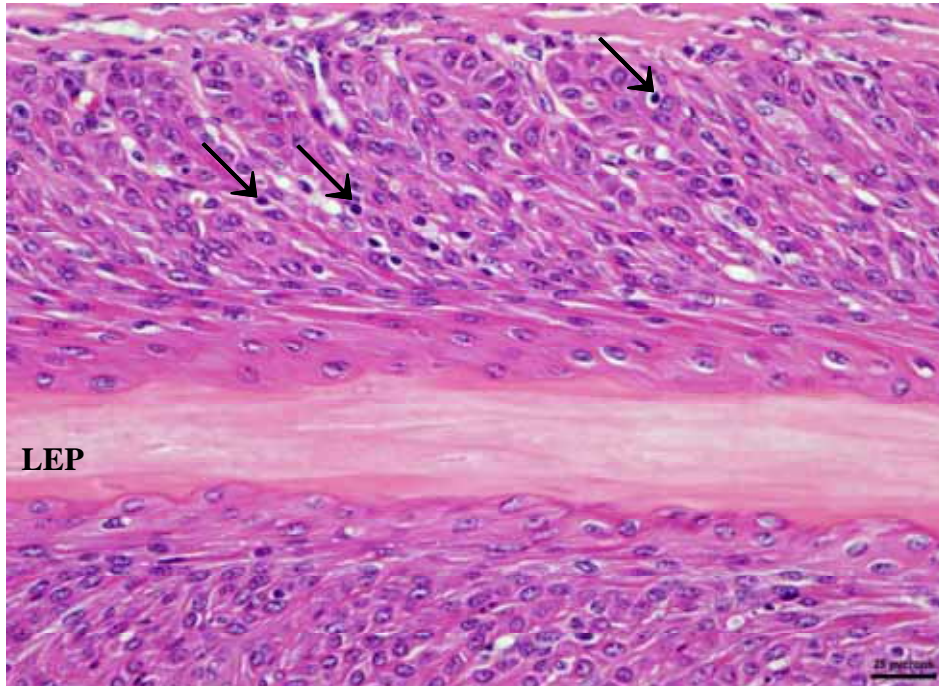
**Figura 22.** Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco antes da obstrução intestinal do cólon menor, na qual se observa a integridade da amostra e a disposição das lâminas epidérmicas primárias (LEP) e lâminas dérmicas primárias (LDP). Hematoxilina-Eosina, obj 10x.



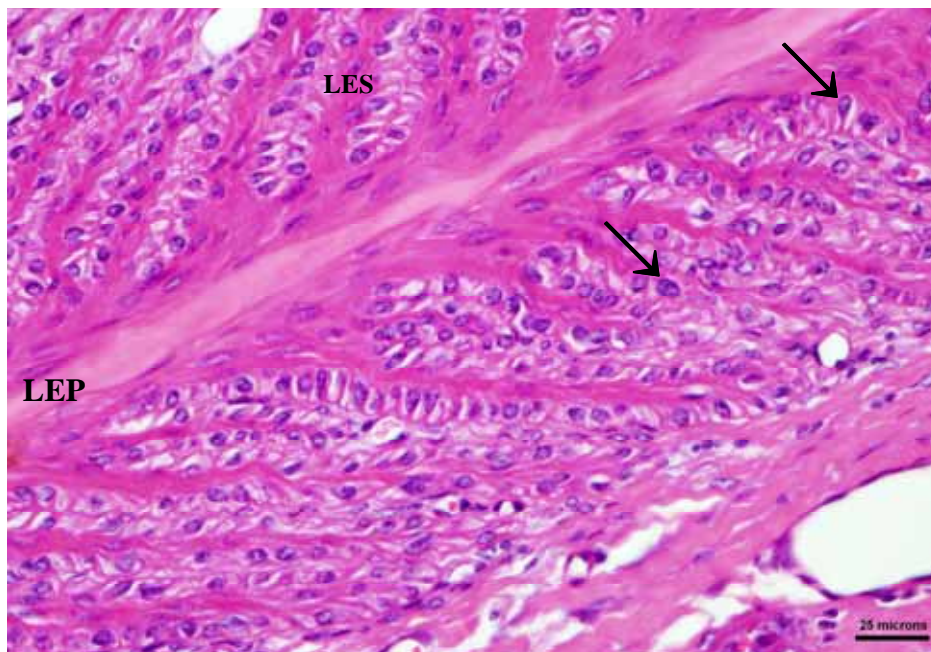
**Figura 23.** Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas secundárias (LDS) do casco antes da obstrução intestinal do cólon menor, visualizando-se a membrana basal contornando nitidamente as lâmina epidérmica secundária (LES) (setas). Ácido Periódico-Schiff, obj 100x.

Em M4, 37,5% dos animais apresentaram as LEP e LES intactas. Porém observou-se que em alguns animais havia perda de posicionamento anatômico dos núcleos dos queratinócitos. Em outros, notou-se a presença de núcleos picnóticos e, em outros, o alongamento das LES. No entanto, a MB manteve-se intacta.

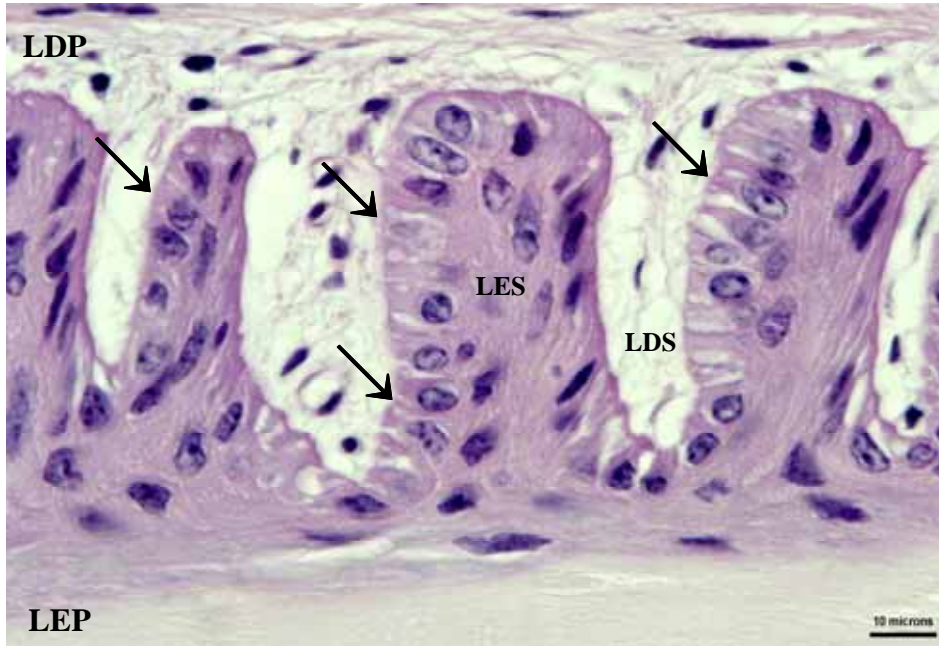
Já em M72, observou-se grande proliferação dos queratinócitos, elevando a distância entre a MB e a porção queratinizada da LEP (Figura 24). Também, verificou-se a presença de núcleos picnóticos (Figura 24), alongamento das LES e perda do posicionamento anatômico dos núcleos (Figura 25). A MB demonstrou alterações, como adelgaçamento (Figura 26) e afilamento (Figura 27). Porém 25% dos animais ainda mantiveram a MB íntegra.



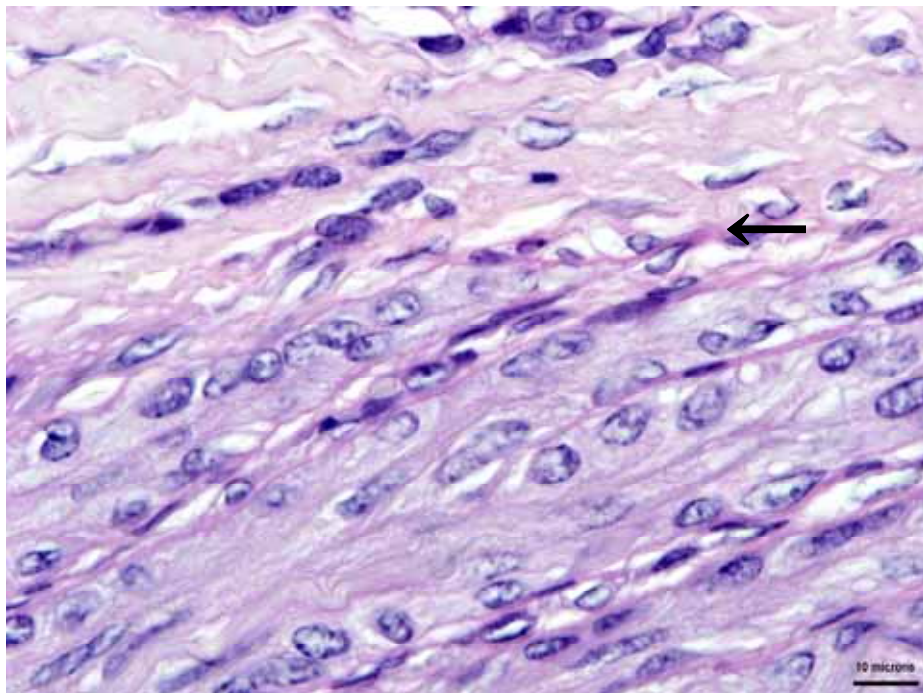
**Figura 24.** Fotomicrografia ilustrando grande quantidade de queratinócitos entre a membrana basal e a porção queratinizada da lâmina epidérmica primária (LEP) e a presença de núcleos picnóticos (setas) presentes nas lâminas epidérmicas secundárias (LES) de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, após 72 horas de desobstrução. Hematoxilina-Eosina, obj 40x.



**Figura 25.** Fotomicrografia ilustrando o alongamento das lâminas epidérmicas secundárias (LES) e a perda do posicionamento anatômico dos núcleos (setas) do casco de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, após 72 horas de desobstrução. Hematoxilina-Eosina, obj 40x.



**Figura 26.** Fotomicrografia ilustrando o adelgaçamento da membrana basal (setas) do casco de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, após 72 horas de desobstrução. Ácido Periódico-Schiff, obj 100x.



**Figura 27.** Fotomicrografia ilustrando o afilamento da membrana basal (seta) do casco de equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor, após 72 horas de desobstrução. Ácido Periódico-Schiff, obj 100x.

## 6. DISCUSSÃO

O acesso cirúrgico ao abdômen de equinos é comumente utilizado para o tratamento de desordens do trato alimentar. O acesso pela linha alba, utilizado neste experimento, em equinos mantidos em decúbito dorsal, sob anestesia geral, foi considerado adequado e eficiente para a realização da obstrução intraluminal do cólon menor. Este acesso possibilita a manipulação de 75% das alças intestinais em animais adultos, com o mínimo de hemorragia, e sem o envolvimento de músculos e nervos (BATHE, 1998). Segundo Faleiros (2003) e Costa (2008), ao utilizarem o acesso cirúrgico pelo flanco, com os equinos em posição quadrupedal, observou-se que, mesmo sem intenção, os animais podem interferir no procedimento cirúrgico, provocando acidentes graves, devido à consciência destes durante o ato cirúrgico. Este fato não foi observado neste experimento, pois os animais estavam sob anestesia inalatória, permanecendo inconsciente durante todo o procedimento cirúrgico.

A utilização de bolas, com diâmetro de 13 cm, na indução de obstrução intraluminal mostrou-se eficaz uma vez que esta, mesmo sob pressão de 80 mm de Hg, não apresentou deformação e não se movimentou pela ação do peristaltismo intestinal. De outro lado, o emprego de balão de látex efetuado por Faleiros (2003) e Teixeira (2011) precisou de fixação frouxa com dreno de Penrose, uma vez que sofreu deformação e se moveu, sob pressão de 40 mm Hg, quando não realizado a ligadura. Sob nossa óptica, a colocação do dreno de Penrose, mesmo serrado levemente induz, por si só, garroteamento vascular e causa isquemia local. Uma vez que o principal objetivo deste trabalho estava associado a produção de obstrução não estrangulativa, optou-se pela busca de metodologia que não promovesse oclusão vascular evitando-se a colocação de qualquer tipo de ligadura, o que só foi obtido com o uso da bola, a qual sob pressão de 80 mm de Hg não se deslocou, mantendo-se posicionada durante as quatro horas da obstrução.

Embora não se tenha neste estudo realizado avaliação da perfusão microvascular na parede intestinal, Faleiros (2003) relatou, que a compressão

intraluminal com pressão de 40 mm de Hg, promove isquemia por diminuição do fluxo sanguíneo no cólon menor. Em suínos também foi observado isquemia, em cólons submetidos a pressões de 45 e 60 mm de Hg (RUF et al. 1980). Como em nosso estudo a pressão foi 100% maior do que a realizada por Faleiros (2003), pode-se concluir que houve redução na perfusão intestinal, o qual pode ser considerado como isquemia.

Durante o acompanhamento clínico dos animais no período pós-cirúrgico, observou-se sinais de desconforto abdominal, os quais foram controlados com a administração de analgésicos. Nas avaliações físicas, os aumentos das FC, FR e  $T_R$  diferiram dos encontrados por Costa (2008), o qual descreve estabilidade da FC e aumento da FR após uma hora de desobstrução, assim como aumento de temperatura retal após 18 horas de reperfusão. Esta diferença temporal em relação aos achados observados por Costa (2008), podem estar relacionados a região obstruída, uma vez que os procedimentos deste autor foram realizados no jejuno e, também, pela laparotomia ter sido realizada no flanco com os animais sob sedação. Avaliações físicas efetuadas em equinos submetidos a laparotomia e enterotomia em posição quadrupedal, não revelaram alterações de FC e FR durante os 180 minutos de duração do procedimento (FALEIROS et al., 2011). Diferentemente de nosso experimento, no qual os procedimentos cirúrgicos se deram sob anestesia geral, nos estudos realizados por Faleiros et al. (2011), Faleiros (2003) e Costa (2008), a avaliação física dos animais foi possível uma vez que estes foram mantidos sedados em tronco de contenção. Os valores de tempo de preenchimento capilar e motilidade intestinal, mesmo não havendo diferença significativa, apresentaram tendência de aumento após a desobstrução, nos mesmos momentos observados por Costa (2008).

À análise do eritrograma, foi possível verificar discreta diminuição de hemácias após quatro horas de obstrução intestinal. Vários estudos experimentais sobre obstrução intestinal associados a enterotomia realizados em equinos também observaram redução nos eritrócitos (VALENTE, 2001; FALEIROS, 2003; TEIXEIRA, 2011). Esta variação foi atribuída a perda de sangue decorrente do procedimento cirúrgico (VALENTE, 2001). A hemorragia e conseqüente diminuição de hemácias ocorria apesar da prática de hemostasia (FALEIROS, 2003). Já no estudo de Di

Filippo (2009), independente do segmento intestinal obstruído, não foram relatadas alterações significativas em eritrócitos. Podendo então, esta redução, estar relacionada à enterotomia, uma vez que, na metodologia utilizada por Di Filippo (2009), não se realizava a enterotomia, apenas promovia-se a interrupção do fluxo com o fechamento do dreno de Penrose.

Relativamente ao leucograma, as principais alterações foram observadas entre 12 e 24 horas após o término do procedimento cirúrgico. Dentre os achados laboratoriais registrados, destaca-se o aumento de polimorfonucleares, incluindo-se tanto células jovens como maduras. A neutrofilia observada foi responsável pela ocorrência da leucocitose registrada 12 horas após iniciar-se a recuperação. Aumentos de leucócitos decorrente de neutrofilia observados após 18 e 8 horas de reperfusão da cirurgia também foram observados por Costa (2008) e Teixeira (2011) respectivamente. Segundo Fagliari; Silva (2002), animais sadios que apenas foram submetidos a laparotomia, apresentaram leucocitose por neutrofilia, com desvio à esquerda, após 24 horas do procedimento cirúrgico. Já os equinos em abdômen agudo, manifestaram leucocitose por neutrofilia, com desvio à esquerda, desde a fase pré-cirúrgica com diminuição contínua a partir de 72 horas após a cirurgia. As alterações observadas neste estudo, certamente estão relacionadas ao tempo de evolução do quadro e a severidade da lesão.

Faleiros (2003), ao avaliar a evolução das contagens de leucócitos durante o procedimento de obstrução intraluminal do cólon menor, não observou aumento do número total de leucócitos neste período, porém, após 150 minutos de obstrução relatou aumento no número de neutrófilos bastonetes, o qual segundo este autor está relacionado ao início da resposta ao estresse e à inflamação. De outro lado, Di Filippo (2009) obteve redução no número de leucócitos durante o período de obstrução intestinal. Esta diminuição pode, segundo a autora, estar relacionada ao processo inflamatório agudo, quando se dá a marginalização dos neutrófilos.

A linfopenia e a eosinopenia observadas no decorrer do experimento estão associadas ao início da resposta inflamatória (M4) (WELLES, 2010). Quadro semelhante também foram observados em descrições prévias (COSTA, 2008). Faleiros (2003), durante a obstrução intraluminal, obteve apenas linfopenia. Já Di Filippo (2009), apenas observou eosinopenia na fase inicial da reperfusão. Estas

diferenças no leucograma, podem estar relacionado com os diferentes momentos da resposta inflamatória e, também, com a intensidade da injúria. Por outro lado, Fagliari; Silva (2002) obtiveram aumento do número de eosinófilos após 48 horas do procedimento cirúrgico em equinos com abdômen agudo. Welles (2010) afirma que o aumento do número de eosinófilos pode ser decorrente dos corticosteróides endógeno liberados durante o estresse.

Acredita-se que o aumento observado nos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito após quatro horas de obstrução (M4), se deve a contaminação sanguínea da cavidade abdominal decorrente do procedimento cirúrgico. Estes achados na cavidade abdominal após procedimento cirúrgico também foram observados por Di Fillipo (2009). Considerando que o aumento de hemácias, hemoglobina e hematócrito no líquido peritoneal em M4 está associado à diminuição destas variáveis no sangue no mesmo momento, é possível inferir uma associação entre eles, na qual, o derrame sanguíneo na cavidade em decorrência do procedimento cirúrgico, de um lado, diminui as variáveis hematológicas, enquanto do outro, as aumenta no líquido peritoneal. Já na porção leucocitária, encontrou-se aumento de leucócitos totais a partir de M12, mantendo-se elevado durante todo o período experimental. Este fato também foi descrito por Di Fillipo (2009) após 180 minutos de reperfusão intestinal e Faleiros et al. (2011) no decorrer do procedimento cirúrgico, após 150 minutos da distensão intestinal. O aumento de leucócitos no líquido peritoneal, quando superior a 10.000 leucócitos/ $\mu$ L é indicativo de peritonite. No entanto, este aumento pode ser decorrente do próprio procedimento cirúrgico, sendo necessário considerar parâmetros clínicos adicionais como depressão, dor abdominal (FARIA; MARQUES JR; AVES, 1999; SANCHEZ, 2007), hipertermia, taquicardia e taquipneia, para se fechar o diagnóstico (MENDES et al., 1999b). Ao se associar os valores de avaliações físicas dos animais submetidos a experimentação com a contagem de células do líquido peritoneal, pode-se afirmar que, os animais não apresentaram quadro clínico de peritonite, este aumento celular no líquido peritoneal está relacionado à resposta inflamatória local, pois após 24 horas de reperfusão intestinal os leucócitos retornaram a valores próximos dos basais.

Na leucocitose peritoneal, destacou-se o aumento significativo de polimorfonucleares, o mesmo relatado por Faleiros (2003) e Costa (2008). Mendes et al. (1999a) ao induzirem peritonite, também observaram o aumento de leucócitos na fase inicial devido ao aumento de células polimorfonucleares. Este achado confirma a migração de neutrófilos para o local da injúria, decorrente do estímulo desencadeado pela lesão tecidual. A ativação de polimorfonucleares está associada a liberação de interleucinas, incluindo TNF, IL-1 e quimiocinas, que induzem esta migração no início da resposta inflamatória (KUMAR et al., 2010).

Para a avaliação das citocinas, no sangue e no líquido peritoneal, foram realizados testes de ELISA sanduíche com kits comerciais específicos para equinos, os quais, permitiram a obtenção de concentrações plausíveis de análises. Faleiros (2003), realizou o mesmo teste para detecção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  tanto em sangue periférico como em líquido peritoneal, porém, segundo o autor, foram utilizados anticorpos para citocinas humanas, o que acarretou grande variabilidade entre indivíduos nas concentrações de IL-6, IL-8 e IL-10 impossibilitando as análises, e para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  não foram obtidas concentrações em nenhuma das amostras.

Neste experimento, verificou-se, na análise do sangue periférico que o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  não apresentaram alteração significativa. No entanto, no líquido peritoneal estas citocinas apresentaram aumento na concentração e na expressão gênica após quatro horas de obstrução intraluminal (M4). O TNF- $\alpha$  está entre os primeiros e mais potentes mediadores da resposta do organismo (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000) e induz a produção de proteínas de fase aguda (WARREN, 2008). Juntamente com a IL-1 $\beta$  são responsáveis pela ativação de células endoteliais, as quais estimulam a expressão de moléculas de adesão e também a produção de outras citocinas (KUMAR et al., 2010). Tal característica explicaria o aumento inicial dessas citocinas no líquido peritoneal, e a posterior diminuição no decorrer do experimento. A rápida liberação de TNF- $\alpha$  no líquido peritoneal está correlacionada aos macrófagos peritoneais e as células mesoteliais que respondem rapidamente às endotoxinas (BARTON; COLLATOS, 1999). A IL-1 $\beta$  também favorece a hematopoiese (WARREN, 2008), o aumento observado desta citocina no presente experimento também pode estar correlacionado com a diminuição observada em M4 na análise

eritrocitária, pois com esta redução no número de hemácias, o organismo pode reagir aumentando a liberação de IL-1 $\beta$  na tentativa de aumentar a produção hematopoiética.

Relativamente a IL-6, não foram detectadas diferença nas concentrações séricas e na expressão gênica desta citocina. Já no líquido peritoneal, observou-se, inicialmente, aumento expressivo tanto da concentração como da expressão gênica, após quatro horas de obstrução e, posteriormente, o seu decréscimo em M72. Lin; Calvano; Lowry (2000) relatam, que a presença de IL-6 na circulação está associada mais propriamente ao grau da lesão tecidual do que à duração do procedimento cirúrgico. Em contrapartida, Moura; Pomerantzeff; Gomes (2001), afirmam que sua concentração no soro se eleva após duas a quatro horas da incisão cirúrgica, podendo se intensificar dependendo da duração da cirurgia. Esta ausência de alteração sérica pode estar associada à gravidade da lesão, pois mesmo havendo isquemia pela compressão da bola na parede intestinal, esta, quando comparada a obstrução estrangulativa, é uma injúria de menor magnitude. Na análise associativa com os parâmetros clínicos, pode-se observar que a injúria causou lesão focal (com aumento da IL-6 na cavidade abdominal), porém começando a se restabelecer durante as 72 horas de reperfusão.

A IL-8 é um potente agente de quimiotaxia, fazendo leucócitos, principalmente neutrófilos, migrarem para o local da infecção ou trauma (MOURA; POMERANTZEFF; GOMES, 2001). Em nosso estudo não foi observado aumento desta citocina no sangue. Na análise da expressão gênica do líquido peritoneal, a IL-8 apresentou aumento de 11.000 vezes em M4, o que levou ao recrutamento das células de defesa para o local da injúria tecidual.

A IL-10 apresentou aumento significativo de aproximadamente 3 vezes na expressão gênica no líquido peritoneal após quatro horas de obstrução. Como esta citocina possui ação anti-inflamatória o aumento observado pode ter inibido a progressão da resposta inflamatória, haja visto a diminuição das concentrações de IL-6 e IL-8 72 horas após a cirurgia. Considerando que a ação da IL-10 diminui a inflamação em curso, pode-se inferir às 72 horas após a cirurgia a ocorrência de quadro semelhante ao da Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória (CARS) (SHERWOOD; TRABER, 2012).

Sabendo que o TNF- $\alpha$  inicia a resposta inflamatória (SHERWOOD; TRABER, 2012), pode-se considerar que o aumento desta citocina na região oral do cólon menor, em M4, pontua o início da inflamação. Já na porção aboral, a redução de TNF- $\alpha$  e o aumento de IL-1 $\beta$  pode indicar que o pico de TNF- $\alpha$  nesta região tenha se dado no decorrer do período de obstrução e não tenha sido detectado. Embora, se considere que a existência de uma elevação de TNF- $\alpha$  tenha sido a responsável pelo aumento da IL-1 $\beta$  cuja expressão gênica apresentou grande amplificação em M4. Na região da obstrução, a baixa expressão das citocinas, pode estar relacionada, em M4, com a isquemia da região e, em M72, com a recuperação da alça intestinal, como foi observado histologicamente na camada mucosa.

Levando em conta que lesões de isquemia e reperfusão podem estar associadas a diferentes complicações pós-cirúrgicas como a laminite (MOORE; MUIR; GRANGER, 1995), nosso estudo buscou avaliar a expressão gênica de algumas citocinas no tecido laminar. Em que pese a distância do foco da lesão, observou-se aumento significativo de TNF- $\alpha$  no tecido laminar em M72. Em avaliações precoces de citocinas no tecido dérmico e epidérmico podal de equinos, com indução de laminite por extrato de noqueira preta, observou-se aumento significativo de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, porém não houveram alterações no TNF- $\alpha$  e na IL-10 (LOFTUS et al., 2007b). Belknap; Black (2005) também descrevem aumento de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 na fase prodrômica da laminite induzida por extrato de noqueira preta. Mesmo considerando o TNF- $\alpha$  como um dos primeiros e mais potentes mediadores da resposta inflamatória do organismo (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000), na análise tecidual podal deste experimento, esta citocina só apresentou aumento após 72 horas de reperfusão intestinal, o que pode estar relacionado com o pico de uma segunda resposta inflamatória podal. Este aumento poderia ser decorrente das biópsias realizadas para a coleta do tecido dérmico e epidérmico do casco. Segundo Hanly et al. (2009), esta técnica de biópsia não induz inflamação secundária, porém a avaliação efetuada por estes autores foi realizada no intervalo de 24 horas, diferentemente do experimento em questão, que perdurou por 72 horas. Esta segunda reação inflamatória, justificariam as alterações encontradas na histologia do casco.

A análise macroscópica do cólon menor durante a escolha do local a ser obstruído, possibilitou a avaliação da parede externa, observando-se a integridade da serosa. Após quatro horas de distensão, a região obstruída apresentava-se delgada ao ponto de ser possível a vibilização da bola através da parede do cólon menor. A observação do balão de látex através da parede intestinal também foi relatada por Faleiros (2003) e Teixeira (2011). Ao final do período de obstrução, no momento da incisão para a retirada da bola, a parede se apresentava delgada e friável. Com o aumento da distensão, a pressão na parede interfere na drenagem venosa e a mucosa torna-se congesta e edematosa (ALLEN; TYLER, 1990). Quarenta e cinco minutos depois da retirada da bola e da reperfusão, tempo este utilizado para suturar os orifícios das biópsias intestinais, observou-se que a parede intestinal apresentava-se edemaciada e espessa, bem como visto por Faleiros (2003) após 90 minutos de desobstrução, o qual descreveu a consistência como a presença de edema.

Na análise histológica do cólon menor, observou-se infiltrado inflamatório discreto nas camadas mucosa, submucosa e serosa durante e após a injúria de isquemia e reperfusão (M4 e M72), confirmando os achados de Faleiros (2003) e Costa (2008). A presença de infiltrado inflamatório na submucosa também foi relatado por Rowe; White (2002), o qual descreveram a presença marcante de infiltrado celular de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e mastócitos na mucosa e submucosa. No decorrer deste estudo, o infiltrado eosinofílico estava presente desde M0, antes da obstrução intestinal, não aumentando durante o decorrer do experimento. Segundo Matos et al. (2000), a presença de eosinófilos nestas camadas intestinais é grande em equinos, porém não parecem possuir importância na fisiopatologia da isquemia e reperfusão. Já Grosche et al. (2011) descrevem que após isquemia de uma hora do cólon maior, não há alteração quanto ao número destes eosinófilos residentes, porém eles são ativados para prevenir mais danos e para iniciar rápida recuperação após reoxigenação tecidual.

Ao avaliar a porção obstruída, tanto a mucosa como o epitélio perderam a integridade em M4. No entanto após 72 horas de reperfusão estas estruturas se apresentavam intactas. Faleiros (2003) descreve apenas redução na espessura da mucosa, e que a superfície apresentava aspecto aplainado após quatro horas de

distensão. Esta diferença de lesão na camada mucosa e o epitélio pode ser decorrente da pressão utilizada no interior do balão, sendo 80 mm de Hg para o presente estudo e 40 mm de Hg utilizado por Faleiros (2003). Também pode ter influenciado na lesão o material mais resistente da bola, o qual não se deformava no interior da alça intestinal. Ao avaliar a porção oral e aboral, não foram vistas alterações nestas camadas intestinais.

Na análise histológica do casco observou-se que em M0, tanto as LEPs como as LDPs se apresentavam integras. As extremidades das LES apresentavam-se arredondadas e o seu eixo longitudinal permanecia posicionado, em geral, em direção a falange distal. A MB também apresentava-se intacta e claramente delineada, sem interrupção, assim como demonstrado por Pollitt (1996; 2004) em descrições do tecido laminar podal de equinos hípidos.

Após quatro horas de obstrução, apenas 37,5% dos animais apresentaram as LEP e LES intactas. Nos outros animais foram observadas alterações como perda do posicionamento anatômico dos núcleos dos queratinócitos, presença de núcleos picnóticos e alongamento das LES. Apesar destas alterações, a MB manteve-se intacta. Alguns destes animais com pequenas alterações, poderiam ser classificados como grau 1 na escala de Pollitt (1996; 2004) e outros como grau 1.5 na escala de classificação de lesões de Laskoski et al. (2010). Com a possibilidade de coleta de tecido laminar podal por biópsia (GRAVENA et al., 2012), foi plausível a coleta e análise após quatro horas de obstrução, momento da reperfusão intestinal, demonstrando assim, que estas alterações podem ter se iniciado com a isquemia, antes mesmo da reperfusão intestinal. Outros estudos identificaram alterações na obstrução intraluminal de jejuno, onde foi possível observar a presença de lesões da derme e epiderme podal de grau 1 e 1.5. No entanto, as amostras só foram obtidas após 18 horas da reperfusão intestinal (LASKOSKI et al., 2010). Rio Tinto et al., (2004) também observaram alterações discretas nas lâminas epidérmicas de equinos submetidos a isquemia e reperfusão por meio de ligadura nos vasos mesentéricos que irrigam o jejuno, sendo estas amostras coletadas após 12 horas do início da reperfusão.

Após 72 horas de reperfusão intestinal observou-se grande proliferação dos queratinócitos, elevando a distância entre a MB e a porção queratinizada das LEPs.

Do mesmo modo, verificou-se a presença de núcleos picnóticos, o alongamento das LES e a perda do posicionamento anatômico dos núcleos. A MB demonstrou alterações, como o seu adelgaçamento e afilamento. Estas alterações podem ser classificadas como grau 2 (POLLITT, 1996). Os trabalhos com isquemia e reperfusão intestinal que avaliam a correlação entre o quadro obstrutivo e o tecido podal, não se prolongam até 72 horas, realizando eutanásia nos animais após 12 horas (RIO TINTO et al., 2004) e 18 horas de reperfusão (COSTA, 2008; LASKOSKI et al., 2010).

Estas alterações no tecido dérmico e epidérmico podal, demonstram que a obstrução intraluminal foi capaz de causar lesões remotas, típicas de isquemia e reperfusão. Faleiros et al. (2008), relataram a presença de lesões remotas em pulmões de equinos obstruídos experimentalmente, diferentemente dos animais apenas cirurgicamente instrumentados, os quais não apresentaram alterações pulmonares. Estas alterações em órgãos distantes, podem estar relacionadas as lesões de reperfusão e ao quadro de SIRS.

## 7. CONCLUSÕES

O uso da bola na indução de obstrução do cólon menor, sob pressão de 80 mm de Hg, é efetiva na promoção de alterações histológicas e inflamatórias tanto locais como sistêmica.

As alterações observadas no tecido podal são características da fase prodrômica de laminite.

As alterações clínicas e histológicas, assim como a resposta inflamatória são características do quadro de SIRS.

## 8. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M. R. Inflamação Aguda. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 101-152.

ANNANE, D.; BELLISANT, E.; CAVAILLON, J.M. Septic shock. **Lancet**, v. 365, p. 63-78, 2005.

ALLEN, Jr. D.; TYLER, D. A. Pathophysiology of acute abdominal disease. In: WHITE, N. A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 65-87.

BARTON, M. H.; COLLATOS, C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 13, p. 457-464, 1999.

BATHE, A. P. Surgical approaches to the abdomen of the horse. **Equine Veterinary Education**, London, v. 10, n. 1, p. 12-15, 1998.

BEHRE, G.; SCHEDEL, I.; NENTWIG, B.; WORMANN, B.; ESSINK, M. HIDDEMANN, W. Endotoxin concentration in neutropaenic patients with suspected gram-negative sepsis: correlation with clinical outcome and determination of anti-endotoxin core antibodies during therapy with polyclonal immunoglobulin M-enriched immunoglobulins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 2139-2146, 1992.

BELKNAP, J. K.; BLACK, S. J. Review of the pathophysiology of the developmental stages of equine laminitis. **AAEP Proceedings...**, v. 51, p. 383-388, 2005.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 430, p.257-263, 2004.

BLACK, S.J.; LUNN, D.P.; YIN, C.; HWANG, M.; LENZ, S.D.; BELKNAP, J.K. Leucocyte emigration in the early stages of laminitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 109, n. 1-2, p. 161-166, 2006.

BLUE, M. G. Enteroliths in horses - a retrospective study of 30 cases. **Equine Veterinary Journal**, v. 11, n. 2, p. 76-84, 1979.

BLUE, M. G.; WITTKOPP, R. W. Clinical and structural features of equine enterolithiasis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 179, n. 1, p. 79-82, 1981.

BOWIE A., O'NEILL L. A. J., The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, p. 508–514, 2000.

CAMPEBELL, R. C.; PEIRÓ, J. R.; ROSA, P. C. S.; VALADÃO, C. A. A.; BECHARA, G. H. Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em eqüinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, 2007.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 581-585, 2006.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885-891, 2002.

CORRÊA, R. R.; ZOPPA, A. L. V.; SILVA, L. C. L. C.; FERNANDES, 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.

COSTA, N. S. **Obstrução experimental de jejuno em eqüinos: efeito da hidrocortisona nos parâmetros clínicos e laboratoriais**. 2008. 128f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Cellular injury and cellular death. In: \_\_\_\_\_. **Robbins e Cotran, pathologic basis of disease**. 5. ed. Philadelphia : Saunders, 1994.: p.1-34.

DAVIES, M. G.; HAGEN, P. O. Systemic inflammatory response syndrome. **British Journal of Surgery**, v. 84, p. 920-935, 1997.

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

DUCHARME, N. G.; HACKETT, R. P.; DUCHARME, G. R.; LONG, S. Surgical treatment of colic results in 181 horses. **Veterinary Surgery**, v. 12, n. 4, p. 206-209, 1983.

EADES, S.C.; STOKES, A.M.; MOORE, R.M. Role of endothelin-1 in black walnut and carbohydrate-induced laminitis. 1<sup>st</sup> Equine Laminitis Research Meeting and Panel, Louisville. American Association of Equine Practitioners Annual Convention, **Proceedings...**, p. 34-40, 2004.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígdos e de equinos acometidos por abdome agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, 2002.

FALEIROS, R.R. **Obstrução experimental do cólon menor equino: Aspectos clínicos, patológicos e terapêuticos**. 2003. 168f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

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

FALEIROS, R. R.; MACORIS, D. G.; SAQUETTI, C. H. C.; AITA, A. C.; FARIAS, A.; MALHEIROS, E. B.; SAMPAIO, I. B. M. Peritoneal fluid changes in horses subjected to small colon distension. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 367-373, 2011.

FARIA, E. P.; MARQUES JR, A. P.; ALVES, G. E. S. Características celulares e bioquímicas do líquido peritoneal de equinos submetidos à peritonite experimental. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 51, n. 4, 1999.

FIGUEIREDO, M. D.; MOORE J. N.; VANDENPLAS, M. L.; SUN, W.; MURRAY, T. F. Effects of the second-generation synthetic lipid A analogue E5564 on responses to endotoxin equine whole blood and monocytes. **American Journal Veterinary Research**, v. 69, n. 6, p. 796-803, 2008.

FLO T. H., HALAAS O., TORP S., RYAN L., LIEN E., DYBDAHL B., SUNDAN A., ESPEVIK T., Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells, **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 474–481, 2001.

FÖRSTERMANN, U., SESSA, W. C. Nitric Oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, p. 829-837, 2012.

GRANGER, D. N.; KORTHUIS, R. J. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 311-332, 1995.

GRAVENA, K.; SAMPAIO, R. C. L.; DIAS, D. P. M.; CANOLA, P. A.; PEIRÓ, J. R.; LACERDA-NETO, J. C. Evaluation of the integrity of horse hoof dermal and epidermal tissues collected by dorsal transmural access. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 12, p. 858-862, 2012.

GROSCHKE, A.; MORTON, A. J.; GRAHAM, A. S.; VALENTINE, J. F.; ABBOTT, J. R.; POLYAK, M. M.; FREEMAN, D. E. Mucosal injury and inflammatory cells in response to brief ischaemia and reperfusion in the equine large colon. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 39, p. 16-25, 2011.

HANLY, B. K.; STOKES, A. M.; BELL, A. M.; JOHNSON, J. R.; KEOWEN, M. L.; PAULSEN, D. B.; SOD, G. A.; MOORE, R. M. Use of serial laminar tissue collection via biopsy in conscious healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 697-702, 2009.

HASSEL, D. M. Enterolithiasis. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 1, n. 3, p. 143-147, 2002.

HASSEL, D. M.; LANGER, D. L.; SNYDER, J. R.; DRAKE, C. M.; GOODELL, M. L.; WYLE, A. Evaluation of enterolithiasis in equids: 900 cases (1973-1996). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 2, p. 233-237, 1999.

HASSEL, D. M.; SCHIFFMAN, P. S.; SNYDER, J. R. Petrographic and geochemic evaluation of equine enteroliths. **American Journal Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 350-358, 2001.

HORNE, M. M.; PASCOE, P. J.; DUCHARME, N. G.; BARKER, I. K.; GROVUM, W. L. Attempts to modify reperfusion injury of equine jejunal mucosa using dimethylsulfoxide, allopurinol, and intraluminal oxygen. **Veterinary Surgery**, v. 23, n. 4, p. 241-249, 1994.

JOHNSON, P.J.; TYAGI, S.C.; KATWA, L.C.; GANJAM, V.K.; MOORE, L.A.; KREEGER, J.M.; MESSER, N.T. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. **The Veterinary Record**, v. 142, p. 392-396, 1998.

KING, J. N.; GERRING, E. L. Detection of endotoxin in cases of equine colic. **Veterinary Record**, v. 123, p. 269-271, 1988.

KUESIS, B.; SPIER, S. J. Endotoxemia. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 550-560.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Inflamação aguda e crônica. In: \_\_\_\_\_. **Robbins e Cotran, Bases Patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 43-78.

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

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.

LOFTUS, J. P.; BELKNAP, J. K.; BLACK, S. J. Matrix metalloproteinase-9 in laminae of black walnut extract treated horses correlates with neutrophil abundance. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 113, p. 267-276, 2006.

LOFTUS, J. P.; BELKNAP, J. K.; STANKIEWICKZ, K.; BLACK, S. J. Laminar xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the prodromal stage of black-walnut induced equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, p. 48-53, 2007a.

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

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

MCDUFFEE, L. A.; SCHIFFMAN, P.; PARROT, J. J. Enterolithiasis in two zebras. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 204, n. 3, p. 430-432, 1994.

MCCORD, J. M. Oxygen derived free-radicals in postischemic tissue injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 3, p. 159-163, 1985.

MEDZHITOV R.; PRESTON-HURLBURT P.; JANEWAY C. A. JR. A human homologue of the *Drosophila Toll* protein signals activation of adaptive immunity, **Nature**, v. 388, p. 394– 397, 1997.

MENDES, L. C. N.; MARQUES, L. C.; BECHARA, G. H.; PPEIRÓ, J. R. Experimental peritonitis in horses: peritoneal fluid composition. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n. 3, p. 493-497, 1999a.

MENDES, L. C. N.; MARQUES, L. C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ÁVILA, F. A. Clinical aspects of experimental peritonitis in horses. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 493-497, 1999b.

MENDES, L. C.; PEIRÓ, J. M. Semiologia do sistema digestório equino. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: A arte do diagnóstico**, São Paulo: Roca, 2004. p. 139-175.

MESCHTER, C. L.; CRAIG, D.; HACKET, R. Histopathological and ultrastructural changes in simulated large colonic torsion and reperfusion in ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 6, p. 426-433, 1991.

METZE, K. Distúrbios da circulação. In: BRASILEIRO FILHO, G. B. **Patologia geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.80-110.

MOORE, J. N. Disease of the small colon and rectum. In: WHITE, N. A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 392-402.

MOORE, J. N. A perspective on endotoxemia. 47<sup>th</sup> Annual Convention of American Association of Equine Practitioners. **Proceedings...**, v. 47, p. 61-74, 2001.

MOORE, R. M.; BERTONE, A. L.; MUIR, W. W.; STROMBERG, P. C.; BEARD, W.L. Histopathologic evidence of reperfusion injury in the large colon of horses after low-flow ischemia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 10, p. 1434-1443, 1994.

MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; GRANGER, D. N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and therapeutic interventions: a review and its implications in the horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, p. 115-132, 1995.

MOURA, H. V.; POMERANTZEFF, P. M. A.; GOMES, W. J. Síndrome da resposta inflamatória na circulação extracorpórea: papel da interleucina. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascula**, v. 16, n. 4, p. 376-387, 2001.

NEUDER, L. E.; KEENER, J. M.; ECKERT, R. E.; TRUJILLO, J. C.; JONES, S. L. Role of p38 MAPK in LPS induced pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in equine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, n. 3-4, p. 192-199, 2009.

PEREIRA, F.E.L. Etiopatogênese geral das lesões. In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed). BOGLIOLO– **Patologia geral**. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1998. p.19-37.

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

POLLITT, C. C. Equine laminitis. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 3, p. 34-44, 2004.

RAKESTRAW, P. C.; HARDY, J. Large intestine. In: AUER, J. A.; STICK, J. A. **Equine Surgery**. 4. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2012. p. 469-470.

RIO TINTO, J. J. M.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R.; SANTOS, R. L.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; MELO, E. G. Utilização de hidrocortisona em equinos submetidos a isquemia e reperfusão no jejuno e suas consequências sobre o cório laminar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 292-299, 2004.

ROY, M. F. Sepsis in adults and foals. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 20, p. 41-61, 2004.

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

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

SANCHEZ, L. C. Gastrointestinal and peritoneal infections. In: SELLON, D. C.; LONG, M. T. **Equine Infectious Diseases**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 39-45.

SHERWOOD, E. R.; TRABER, D. L. The systemic inflammatory response syndrome. In: HERDON, D. N. **Total burn care**. 4. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2012. p. 249-263.

SNYDER, J. R.; SPIERS, S. J. Abnormal conditions of the descending (small) colon. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. St. Louis: Mosby, 1996. p. 774-775.

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.

URIU, K.; OSAJIMA, A.; HIROSHIGE, K.; WATANABE, H.; AIBARA, K.; INADA, Y.; SEGAWA, K.; ANAI, H.; TAKAGI, I.; ITO, A.; KAMOCHI, M.; KAIZU, K. Endotoxin removal by direct hemoperfusion with an absorbant column using polymixin B-immobilized fiber ameliorates systemic circulatory disturbance in patients with septic shock. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, p. 747-937, 2002.

WARREN, L. K. Potencial immune-stimulatory nutrients for the equine athlete. European equine nutrition & health, **Proceedings...**, 2008.

WELLES, E. G. Interpretation of equine leukocyte responses. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p. 314-320.

WERNERS, A.H.; BULL, S.; FINK-GREMMELS, J. Endotoxaemia: a review with implications for the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, p. 371-383, 2005.

WHITE, N. A. Epidemiology and etiology of colic. In: \_\_\_\_\_. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 49-64.

WONG, J. M.; BILLIAR, T. R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. **Advances in Pharmacology**, v. 34, p. 155-170, 1995.

VALENTE, P. P. **Estudo comparativo de aspectos hemáticos e de características físico-químicas e citológicas do fluido peritoneal de equinos submetidos a enterorragias em planos aposicional e invaginante no cólon descendente**. 2001. 170f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.