

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

**AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL E DA EXPRESSÃO
DE METALOPROTEINASES 2 E 9 DE EQUINOS COM
OBSTRUÇÃO EXPERIMENTAL DO CÓLON MENOR**

Beatriz de Assis Pimenta

Médica Veterinária

2016

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

**AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL E DA EXPRESSÃO
DE METALOPROTEINASES 2 E 9 DE EQUINOS COM
OBSTRUÇÃO EXPERIMENTAL DO CÓLON MENOR**

Beatriz de Assis Pimenta

Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

Coorientadora: Dra. Kamila Gravena

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

2016

Pimenta, Beatriz de Assis
P644a Avaliação clínico-laboratorial e da expressão de metaloproteinases
2 e 9 de equinos com obstrução experimental do cólon menor /
Beatriz de Assis Pimenta. -- Jaboticabal, 2016
xix, 68 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: José Corrêa de Lacerda Neto
Banca examinadora: Annelise Carla Camplesi dos Santos, Fabiana
Garcia Christovão
Bibliografia

1. *Cólica*. 2. Isquemia. 3. Metaloproteinase. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.348:636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

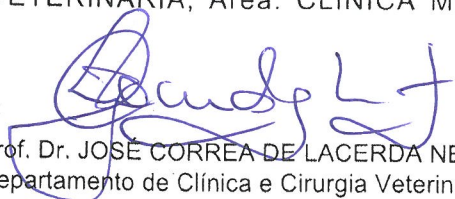
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL E DA EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES 2 E 9 DE EQUINOS COM OBSTRUÇÃO EXPERIMENTAL DO CÔLON MENOR

AUTORA: BEATRIZ DE ASSIS PIMENTA

ORIENTADOR: JOSÉ CORREA DE LACERDA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOSÉ CORREA DE LACERDA NETO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. FABIANA GARCIA CHRISTOVÃO
Faculdades Associadas de Uberaba / Uberaba/MG

Jaboticabal, 15 de janeiro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BEATRIZ DE ASSIS PIMENTA – nascida em Barretos, São Paulo, em 05 de Junho de 1986, filha de Julio de Assis Pimenta e Arlete Gonçalves de Souza Pimenta, concluiu o Ensino Fundamental e Médio no Colégio Técnico Soares de Oliveira, em Barretos, SP. Em janeiro de 2013, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade “Dr. Francisco Maeda” - FAFRAM, Campus de Ituverava, SP, onde desenvolveu o trabalho de conclusão de curso intitulado “Correlação entre nível de estresse e lesão muscular em equinos submetidos à prova de três tambores”, sob orientação da Profa. Dra. Fabiana Garcia Christovão. Em março de 2013, ingressou no Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, no curso de Mestrado, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP, sob orientação do Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto.

“Acho que é, justamente, nos momentos difíceis e nas situações de frustração que se comprova a força e o caráter de cada um, tornando os problemas e a frustração em estímulos para dar a volta por cima.”

Ayrton Senna

*Dedico esta dissertação ao meu amado
afilhado, Lorenzo Prado Nunes, que veio para
alegrar os meus dias, já que a sua vida dá mais
sentido à minha!! Ao seu lado aprendo a
doçura de ser criança outra vez.*

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora de Fátima, que me acompanham, incondicionalmente, por esse caminho da vida, concedendo-me proteção, forças para resistir e persistir, coragem e determinação para seguir em busca dos meus sonhos e, principalmente, por todos os dias renovar e fortalecer a minha fé!

Aos meus pais, Julio de Assis Pimenta e Arlete Gonçalves de Souza Pimenta, que abdicaram de seus próprios sonhos para que os meus se tornassem possíveis, sobretudo, pelo apoio e incentivo concedido diante das minhas metas e incertezas. Agradeço pelo amor, carinho, educação e aos princípios que me ensinaram.

À minha família, por toda a compressão, solidariedade e por sempre me proporcionarem estímulo, apoio e incentivo. Agradeço, imensamente, por me fortalecerem no momento mais delicado de minha vida, impedindo assim que eu desanimasse.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto, por ter me aceitado junto a sua equipe de trabalho; pelos ensinamentos compartilhados e aos conselhos repassados.

À minha coorientadora, Dra. Kamila Gravena, por toda a colaboração durante a execução deste trabalho, pelas sugestões e correções sugeridas.

À Profa. Fabiana Christovão Garcia, querida professora e orientadora da Graduação e, neste momento, professora convidada para compor a banca examinadora deste trabalho. Agradeço, pela doçura nas palavras e, principalmente, por acreditar em mim!

À Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi dos Santos, por ter aceitado o convite para compor a banca examinadora do exame de qualificação e de defesa, proporcionando valiosas sugestões e correções deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Aléscio Canola, por também ter aceitado o convite para compor a banca examinadora do exame de qualificação e contribuído com o aprimoramento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, coordenador do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, por toda a compreensão e generosidade ao intervir nos momentos que dele precisei.

À Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado, da Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba/SP, por conceder a utilização do Laboratório de Patologia Aplicada – LApap e, desta forma, viabilizar a realização das análises zimográficas. Agradeço, principalmente, pela generosidade em disponibilizar materiais próprios em benefício deste estudo.

Ao Dr. Paulo Ricardo Dell’Armeline Rocha, por todo auxílio e paciência ao me ensinar a técnica zimográfica, pois sem essa, nada disso seria possível, pela confiança, pelas orientações e, sem dúvida, por todos os esclarecimentos e incentivos.

Ao querido Dr. Guilherme Dias de Melo, mesmo ausente, não poupou esforços para me auxiliar, nas dúvidas, questionamentos e indagações, sempre com muita humildade e paciência. Além, é claro, de toda a gentileza em dividir os seus vastos conhecimentos em prol do meu aprendizado.

Aos meus eternos amigos, companheiros e parceiros de profissão, Marcos Vinícius Jardim Sandrin (Markin), Vinícius da Silva Rodrigues (Pesca), Gabriel Campos Pimentel (Tripa) e Vinícius Fleury Guedes Martins (Beijo), por todo o apoio, incentivo, solidariedade e, principalmente, encorajando-me a enfrentar o infortúnio pessoal. Obrigada, por compreenderem a minha ausência e entenderem que não há distância para aqueles que estão dentro do coração!

Aos amáveis e inesquecíveis amigos que conquistei em Araçatuba-SP, ao longo deste trabalho e, em especial, a Ana Carolina Borsanelli (Carol), Juliane Teramachi Trevizan (Ju), Fernanda Grecco Grano (Fefê), José Eduardo Santos da Silva (Du), Milena Sato de Souza (Mi) e in memoriam ao Augusto Schweigert (Guto),

que me receberam e me acolheram de forma tão carinhosa, verdadeira e, principalmente, respeitosa. Agradeço pela cumplicidade, companheirismo e solidariedade, durante a realização da zimografia; nas refeições; nos momentos pessoais e, principalmente, pela amizade que permanece e fortalece mesmo a distância!

Aos meus inesquecíveis amigos, irmãos e companheiros de profissão Rafael Mamede Tosi e Rene Moraes Girardi, os quais se fizeram presentes intensamente ao longo da graduação e que sempre me estimularam para seguir a diante. Ainda que, neste momento estejamos distantes sei que a amizade permanece a mesma ou até mais verdadeira.

Ao querido Dr. Reinaldo de Campos e sua esposa Dra. Fernanda Manzano de Campos, agradeço pela oportunidade de estágio; pela amizade; pelo carinho; pelo respeito e, principalmente, pelos exemplos e ensinamentos inolvidáveis que compartilham comigo, no âmbito profissional e pessoal.

As minhas queridas amigas Gabriela de Lima Araújo, Eugênia dos Santos Moreira, Laisa dos Santos Borba, Fernanda Coutinho de Freitas e Gabriela Siqueira de Martins, por todo carinho, companheirismo, descontração, apoio e incentivo. Obrigada, por me acolherem nos momentos de conquista e de languidez.

Às queridas amigas Annita Moraes Girardi e Viviane Carla Fortulan, ex-companheiras de casa e as quais sempre irei considerá-las como irmãs. Apesar da distância jamais deixarão de viver no meu coração, nas minhas orações e nas minhas lembranças. Agradeço, com todo amor e respeito, por todos os momentos que compartilhamos dos quais guardo com carinho e saudades.

Aos demais amigos e companheiros de equipe Vinícius Athaydes Canello, Antônio Fernando Bariani Junior, Nara Saraiva Bernardi e Daniela Junqueira de Queiroz, por todo auxílio, incentivo e companheirismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual não seria possível a realização do meu mestrado.

À Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (UNESP-FCAV) e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela indescritível oportunidade ao proporcionar a realização deste sonho.

À todos os funcionários da Pós-graduação, em especial à Branca, Márcia, Moisés e Fernanda por me atenderem com tanto respeito, compreensão e dedicação; sempre dispostos a esclarecem as dúvidas e solucionarem os imprevistos.

Às queridas funcionárias Dona Dalva e Cirlene, por sempre me receberem com um sorriso e, claro, por me atenderem com carinho e sutileza.

Àqueles que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma acrescentaram valores em prol da finalização deste sonho.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Síndrome Cólica	2
2.2. Injúria de Isquemia e Reperusão	5
2.3. Metaloproteinases de Matriz (MMPs)	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Animais	18
3.2. Exame Físico	18
3.3. Cuidados Pré-Cirúrgicos	19
3.4. Procedimentos Anestésicos	19
3.5. Procedimentos Cirúrgicos	20
3.6. Cuidados Pós Cirúrgico	22
3.7. Colheita e Processamento do Sangue Venoso	23
3.8. Colheita e Processamento do Líquido Peritoneal	23
3.9. Procedimentos Laboratoriais	25
3.9.1 Avaliação Eritroleucométrica e Citológica do Líquido Peritoneal	25
3.9.2 Análise Zimográfica das Metaloproteinase 2 e 9	25
3.10 Análises Estatísticas	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Parâmetros Clínicos	27
4.2. Avaliação Hematológica.....	27
4.3. Avaliação do Líquido Peritoneal.....	30
4.4. Avaliação Zimográfica.....	32

4.4.1 Plasma.....	32
4.4.2 Líquido Peritoneal.....	34
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS	49
APÊNDICES	65
1. Técnica Descritiva para a Preparação dos Géis	66
2. Gráficos referentes à atividade gelatinolítica de metaloproteinases 2 e 9 no plasma e líquido peritoneal	68



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



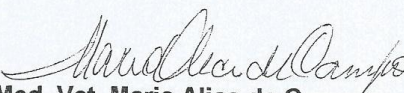
CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

CERTIFICADO

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

Jaboticabal, 27 de abril de 2009.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEBEA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEBEA

AValiação CLÍNICO-LABORATORIAL E DA EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES 2 E 9 DE EQUINOS COM OBSTRUÇÃO EXPERIMENTAL DO CóLON MENOR

RESUMO – A síndrome do abdômen agudo é uma das afecções que mais se destaca no atendimento clínico cirúrgico para a espécie equina. A obstrução do cólon menor é causada principalmente pela compactação de massas ou por enterólitos, acarreta em distensão intraluminal e, consequentemente obstrução dos vasos sanguíneos que irrigam a parede do órgão, desencadeando processo isquêmico. Por conseguinte, ocorrem no organismo alterações metabólicas e enzimáticas, como ativação leucocitária e liberação de enzimas proteolíticas, em direção ao local da injúria. Foram avaliadas as alterações clínicas, hematológicas, celularidade do líquido peritoneal, além da expressão de metaloproteinase 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), em oito equinos, hípidos, adultos, submetidos experimentalmente à obstrução simples de cólon menor, durante 4 horas, por meio de inserção de balão de látex, sob pressão de 80mmHg. Os parâmetros clínicos, hematológicos e o fluido peritoneal foram avaliados antes da obstrução intestinal (M0), imediatamente após a obstrução intestinal (M4) e em intervalos de 12 horas até completarem 72 horas após desobstrução do cólon menor (M72). As atividades gelatinolíticas de MMP-2 e MMP-9, no plasma e líquido peritoneal foram obtidas em M0, M4 e M72, posteriormente submetidas à análise zimográfica. Através do exame físico constatou-se aumento da frequência cardíaca e temperatura retal em M12 e da frequência respiratória em M24. A porção eritrocitária do hemograma não apresentou diferenças significativas, mas evidenciou diminuição discreta de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas em M4. Já o leucograma indicou aumento de leucócitos em M12 e M24 e diminuição na resposta leucocitária a partir de M36 ($p \leq 0,05$). Em relação à celularidade do líquido peritoneal verificou-se aumento estatístico dos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito em M4, dos leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares em M12. A análise da expressão das MMPs evidenciou apenas expressão das MMPs em sua forma inativa (PróMMP-2 e PróMMP-9). No plasma, só a expressão da PróMMP-2 diferiu estatisticamente entre os momentos avaliados, exceto quando comparado M0 e M72. Já no líquido peritoneal, a PróMMP-2 apresentou diferença estatística em M72 quando comparado aos demais momentos e a PróMMP-9 apresentou diferença estatística somente em M4. Com base nos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que o modelo experimental para obstrução simples do cólon menor promoveu alterações funcionais relevantes, essencialmente, ativação da resposta inflamatória tanto no sangue como no líquido peritoneal, principalmente pelo aumento do número de polimorfonucleares que são responsáveis pela liberação de MMPs.

Palavras-chave: cólica, isquemia, lesão reperfusão, zimografia, enzima proteolítica

EVALUATION CLINICAL LABORATORY AND EXPRESSION OF METALLOPROTEINASE 2 AND 9 OF EQUINE WITH OBSTRUCTION EXPERIMENTAL OF SMALL COLON

ABSTRACT – The syndrome of acute abdomen is one of the diseases that most stands out in the surgical clinical care to the equine species. The obstruction of the lower colon is mainly caused by mass or compression for enterólitos, carries on intraluminal distension and, consequently clogging of blood vessels supplying the organ, triggering ischemic process. Therefore, occur in the body and metabolic changes of enzymes, such as leukocyte activation and proteolytic enzymes release, toward the site of the injury. Were evaluated clinical, haematological changes, peritoneal fluid cellularity, beyond the expression of metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), in eight horses, healthy adults, subjected experimentally to simple obstruction of colon minor, during 4 hours, through the insertion of latex balloon, under pressure of 80mmHg. Clinical, hematological parameters and the peritoneal fluid were evaluated before the intestinal obstruction (M0), immediately after the bowel obstruction (M4) and at intervals of 12 hours until they reach 72 hours after clearing the lower colon (M72). Gelatinolíticas activities of MMP-2 and MMP-9, plasma and peritoneal fluid were obtained in M0, M4 and M72, subsequently submitted to zimográfica analysis. Through the physical exam found an increase in heart rate and rectal temperature in M12 and the respiratory rate in M24. The portion of the erythrocyte hemogram showed no significant differences, but showed discrete red blood cells, hemoglobin decrease, hematocrit and platelets in M4. Already the WBC indicated increase of leukocytes in M12 and M24 and decreased leukocyte response from M36 ($p \leq 0.05$). Regarding the cellularity of peritoneal fluid was found statistical increase of the values of red blood cells, hemoglobin and hematocrit in M4, leukocytes, mononuclear and polymorphonuclear in M12. The analysis of the expression of MMPs showed just expression of MMPs in its inactive form (PróMMP-2 and PróMMP-9). In the plasma, just the expression of PróMMP-2 differed statistically among the evaluated moments, except when compared M0 and M72. In the peritoneal fluid, the PróMMP-2 showed statistical difference in M72 when compared to other times and the PróMMP-9 presented statistical difference only in M4. Based on the results obtained in this work it is possible to conclude that the experimental model for simple obstruction of the colon less promoted relevant functional changes, essentially, activation of the inflammatory response in both the blood as in the peritoneal fluid, primarily by increasing the number of polymorphonuclear which are responsible for the release of MMPs.

Keywords: colic, ischemia, reperfusion injury, zymographic, proteolytic enzyme

LISTA DE ABREVIATURA

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg/mL	Microgramas por Mililitros
µL	Microlitros
ATP	Adenosina Trifosfato
Bas	Bastonetes
bpm	Batimentos por Minuto
BSA	Albumina Sérica Bovina
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
cm	Centímetros
COX-2	Ciclooxigenase 2
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
Eos	Eosinófilos
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
g	Gramas
He	Hemácias
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
IV	Intravenoso
K ⁺	Potássio
kDa	Quilodaltons
kg	Quilograma
Le	Leucócitos
Lin	Linfócitos
M	Molaridade
mA	Miliampere
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimol
mmHg	Milímetros de Mercúrio
MMPs	Metaloproteinases
Mon	Monócitos
Mono	Mononucleares
mpm	Movimentos por Minuto
M0	Momento Antes da Indução Anestésica
M4	Momento Após Quatro Horas de Obstrução Intestinal

M12	Momento 12 Horas Pós-Cirurgia
M24	Momento 24 Horas Pós-Cirurgia
M36	Momento 36 Horas Pós-Cirurgia
M48	Momento 48 Horas Pós-Cirurgia
M60	Momento 60 Horas Pós-Cirurgia
M72	Momento 72 Horas Pós-Cirurgia
NaN ₃	Azida Sódica
NB	Neutrófilos Bastonetes
nm	Nanômetro
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PAM	Pressão Arterial Média
pH	Potencial Hidrogeniônico
Plaq	Plaquetas
PMN	Polimorfonucleares
PSA	Persulfato de Amônio
qsp	Quantidade Suficiente Para
ROLS	Radicais Livres de Oxigênio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
TIMPs	Inibidores Teciduais Endógenos de Metaloproteinases
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TPC	Tempo de Preenchimento Capilar
T _R	Temperatura Retal
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo do acúmulo de cálcio intracelular na lesão celular	7
Figura 2.	Esquema representativo da produção de espécies reativas de oxigênio	8
Figura 3.	Esquema representativo dos eventos que ocorrem na célula durante lesão de isquemia e reperfusão	9
Figura 4.	Esquema representativo das etapas da migração de neutrófilos ao longo dos vasos sanguíneos	11
Figura 5.	Esquema representativo da estrutura dos domínios das metaloproteinases de matriz	13
Figura 6.	Esquema representativo da estrutura de MMP-2 e MMP-9	14
Figura 7.	Principais grupos das metaloproteinases de matriz com suas respectivas nomenclaturas	15
Figura 8.	Imagem fotográfica durante o procedimento de celiotomia, para obstrução do cólon menor em equino.	21
Figura 9.	Abdominocentese em equino submetido à obstrução intraluminal do cólon menor.	24
Figura 10.	Evolução das variáveis clínicas de frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal de equinos submetidos à obstrução experimental simples do cólon menor.	28
Figura 11.	Evolução na contagem total de leucócitos e neutrófilos séricos de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor.	30
Figura 12.	Evolução na contagem total de leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares do líquido peritoneal de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor.	31
Figura 13.	Imagem do zimograma demonstrando bandas de metaloproteinase (MMPs) inativas, no plasma de equinos submetidos à obstrução intestinal do cólon menor.	32
Figura 14.	Atividade gelatinolítica de PróMMP-2 e PróMMP-9 no plasma de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor.	33
Figura 15.	Imagem do zimograma evidenciando bandas de	34

metaloproteinases (MMPs) inativas, no líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução intestinal do cólon menor.

Figura 16. Atividade gelatinolítica de PróMMP-2 e PróMMP-9 no líquido 35
peritoneal de equinos submetidos experimentalmente à
obstrução simples do cólon menor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Médias ($\pm$ EPM) das variáveis clínicas de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (T_R) de equinos submetidos à obstrução experimental simples do cólon menor.	27
Tabela 2.	Médias ($\pm$ EPM) das variáveis hematológicas sanguíneas de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor.	29
Tabela 3.	Médias ($\pm$ EPM) das variáveis leucocitárias sanguíneas de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor.	30
Tabela 4.	Médias ($\pm$ EPM) das variáveis hematológicas avaliadas no líquido peritoneal de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor.	31
Tabela 5.	Médias ($\pm$ EPM) e medianas das PróMMP-2 e PróMMP-9 plasmáticas, de equinos submetidos à obstrução intestinal do cólon menor.	33
Tabela 6.	Médias ($\pm$ EPM) e medianas das PróMMP-2 e PróMMP-9 do líquido peritoneal, de equinos submetidos à obstrução intestinal do cólon menor.	35

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de abdômen agudo é de suma importância para a espécie equina, tendo ampla ocorrência mundial no cenário equestre, pois constitui a principal causa de óbito em animais adultos, além de acarretar prejuízos econômicos devido aos elevados custos com o tratamento. Dentre os diversos tipos de cólicas se destacam as obstruções do cólon menor, as quais são causadas principalmente pela compactação de massas ou por enterólitos, acarretando em distensão intraluminal e, consequentemente obstrução dos vasos sanguíneos que irrigam a parede do órgão.

A isquemia se caracteriza pela redução ou interrupção do fluxo sanguíneo a determinados órgãos ou tecidos, o que resulta em uma série de alterações metabólicas e enzimáticas. A redução da perfusão sanguínea ativa as células endoteliais dos vasos responsáveis pela irrigação tecidual no intestino. A lesão no epitélio intestinal estimula as células epiteliais adjacentes a produzirem citocinas, que por sua vez aumentam o recrutamento de neutrófilos e a permeabilidade vascular, propiciando a ativação, migração, rolamento, adesão e diapedese de leucócitos em direção ao local da injúria.

Em seguida, ocorre a liberação de enzimas proteolíticas, dentre elas as metaloproteinases que tem como função a degradação e o remodelamento dos mais variados componentes da matriz extracelular. Deve-se ressaltar que observações recentes fornecem evidências que as metaloproteinases participam na patofisiologia de diversas doenças inflamatórias intestinais.

Porém, infelizmente, ao consultar a literatura em busca de informações a respeito da atividade gelatinolítica das metaloproteinases 2 e 9 no sangue e líquido peritoneal de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor nada foi constatado, por conseguinte verificou-se a relevância em desenvolver estudo que fornecesse tais conhecimentos.

O presente trabalho objetivou avaliar as alterações clínicas, hematológicas, peritoneais e, pela primeira vez, analisar a expressão de metaloproteinase 2 e 9, no plasma e líquido peritoneal de equinos com obstrução experimental do cólon menor.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SÍNDROME CÓLICA

A enfermidade que mais acomete animais da espécie equina é a síndrome cólica, também conhecida por abdômen agudo (ABUTARBUSK; CARMALT; SHOEMAKER, 2005). O distúrbio é definido como um conjunto de desordens cuja principal manifestação clínica é a dor abdominal (BERMEJO et al., 2008; FERREIRA et al., 2009), que pode ser causada tanto por disfunções do trato gastrointestinal como, porém menos comumente, por afecções localizadas em sistemas diferentes do digestório (CORRÊA et al., 2006). A cólica é considerada uma das enfermidades que mais requer atendimento veterinário no setor de clínica médica e cirúrgica equina (TRAUB-DARGATZ et al., 2001).

Apesar dos intensos avanços quanto aos métodos diagnósticos, técnicas anestésicas e cirúrgicas, aliados ao acompanhamento intensivo no período pós-operatório (THOEFNER et al., 2003), ainda assim a cólica é a maior causa de óbitos nos equinos (THOMASSIAN, 2005). Do mesmo modo, é responsável por grandes prejuízos econômicos aos criadores devido aos custos elevados do tratamento (TRAUB-DARGATZ et al., 2001), tempo prolongado de afastamento de suas atividades cotidianas e perdas decorrentes de infecções e abortos (SANTSCHI et al., 1991; BOENING; LEENDERTSE, 1993).

De acordo com White (1990) e Thomassian (2005) a etiologia é múltipla e controversa, pois as possíveis causas variam desde alterações abruptas na dieta, sobrecarga alimentar, ingestão de areia, agentes infecciosos, parasitoses e enterólitos. A privação ou diminuição da ingestão hídrica, mudança na rotina de atividade e as alterações nas condições de estabulação e transporte em viagens também podem influenciar na ocorrência de síndrome cólica (HILLIYER; TAYLOR; FRENCH, 2001).

A classificação das cólicas se baseia nas características das diferentes alterações morfofuncionais e na gravidade das lesões em diferentes segmentos do trato gastrointestinal (MENDES; PEIRÓ, 2008). Neste sentido, os distúrbios são

divididos em obstruções estrangulativa ou simples, enterites ou colites e infartos não estrangulativos (WHITE, 1990).

De acordo com estudos epidemiológicos desenvolvidos em clínicas e hospitais veterinários dos EUA, constatou-se que a obstrução simples, a cólica espasmódica e as compactações são as mais comumente diagnosticadas (WHITE, 1990; WHITE, 2005). Em estudo dirigido por Laranjeira et al. (2009), na cavalaria militar do Rio de Janeiro, evidenciou-se alta incidência de episódios de síndrome de cólica de origem gástrica, contudo, ainda são escassos os estudos nacionais acerca da etiologia do abdômen agudo considerando as diversas regiões brasileiras.

À obstrução intestinal simples tem sido considerada a principal causa de internação e óbitos em equinos, a qual interrompe o fluxo da ingesta e proporciona distensão luminal, com ou sem comprometimento vascular local (FALEIROS et al., 2007; COSTA et al., 2010). Este processo pode ser desencadeado, principalmente, pela compactação de massas desidratadas de ingesta, acúmulo de areia, presença de concreções, ingestão de corpos estranhos ou formação de enterólitos (RHOADS, 1999; MIRZA et al., 2005; FALEIROS et al., 2007).

Ferreira et al. (2009) afirmam que, nos períodos de outono e inverno, a compactação do cólon menor é mais frequente e que tal predileção sazonal está, provavelmente, relacionada a modificações na dieta e ao consumo ineficiente de água. Contudo, ainda permanecem incertos os mecanismos associados ao acúmulo de ingesta no intestino grosso. Acredita-se que os principais responsáveis sejam a alteração do fluxo do bolo alimentar (quilo) e/ou secreção e absorção de fluido pelo trato gastrointestinal (JONES; SNYDER; SPIER, 2000).

Semelhantemente, dentre os diversos fatores que desencadeiam a enterolitíase, se destacam as dietas ricas em farelo de trigo (McDUFFE; SCHIFFMAN; PARROT, 1994), devido aos elevados níveis de proteína, fosfato e magnésio encontrados neste alimento (HASSEL, 2002). Do mesmo modo, o fornecimento de feno de alfafa em grandes volumes também pode predispor ao quadro, uma vez que tal alimento possui concentração de magnésio seis vezes

maior do que as necessidades diárias para a espécie (SNYDER; SPIER, 1996; VERVUERT; COENEN, 2003).

Os enterólitos são concreções de estruvita constituídas de fosfato de amônio e magnésio (BLUE; WITTKOPP, 1981; MURRAY; GREEN; CONSTANTINESCU, 1992; HASSEL, 2002). Em geral, se acumulam ao redor de um núcleo normalmente constituído por corpo estranho como pequenas pedras ou metais ingeridos acidentalmente (CORRÊA et al., 2006). Estes permanecem no lúmen intestinal sem causar maiores alterações até atingirem proporções que possam obstruir a luz do órgão parcial ou totalmente (McILWRAITH; ROBERTSON; TURNER, 1998; MAIR; DIVERS; DUCHARME, 2002). É justamente nas porções mais delgadas do intestino grosso como, flexura pélvica, cólon transverso e cólon menor que os cálculos maiores e mais regulares causam obstrução, principalmente, nas duas últimas localizações (CORRÊA et al., 2006).

Clinicamente, os animais com obstrução simples inicialmente expressam desconforto abdominal de intensidade leve e característica intermitente, conforme o grau de obstrução e tempo de evolução, o qual permanece até que ocorra completa obstrução do lúmen intestinal. A partir de então, a dor que se instala apresenta caráter severo e manifestação contínua (ROSS; HANSON, 1992). Em decorrência das alterações que ocorrem nas alças intestinais há repercussão direta sobre os constituintes de fluidos orgânicos, sendo que tal alteração ocorre de acordo com o tempo, localização e gravidade do processo obstrutivo (PARRY; BROWNLOW, 1992). Por esta razão, a análise do líquido peritoneal se faz necessária e imprescindível, a fornecer subsídios relevantes quanto à integridade da parede intestinal (SPIER; SNYDER, 1992).

Diante da progressão da lesão entérica que se desenvolve nos casos de infarto e necrose da parede intestinal, há o extravazamento de elementos plasmáticos do leito vascular e migração de leucócitos, elevando o número de células brancas e proteínas na cavidade peritoneal, tornando-o de coloração mais turva (MACKAY, 1992; CORRÊA et al., 2006). À medida que o quadro clínico se agrava, pode ocorrer diapedese de eritrócitos e leucócitos, desencadeando

alterações ainda mais expressivas no líquido peritoneal que passa, então, da coloração âmbar para a avermelhada (BLUE; WITTKOPP, 1981).

A resolução dos casos obstrutivos de intestino grosso, causados por enterólitos, requer tratamento cirúrgico, por meio de celiotomia e enterotomia e o sucesso do tratamento esta associado ao diagnóstico precoce e indicação cirúrgica em tempo hábil (CORRÊA et al., 2006).

2.2 INJÚRIA DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

As obstruções intestinais proporcionam comprometimento do aporte sanguíneo venoso e/ou arterial, acarretando em hipóxia e, conseqüentemente, lesão tecidual (MATOS et al., 2000; PAGLIOSA, 2009). Por intermédio do advento das pesquisas referentes à gastroenterologia, constatou-se que alças intestinais consideradas viáveis durante a intervenção cirúrgica evoluíam, no período pós-operatório, para o quadro de necrose e, tais insucessos foram inicialmente considerados falhas de interpretação da intensidade da lesão presente no tecido durante a cirurgia (MATOS et al., 2000). Ainda que extremamente fundamental, a restauração do fluxo sanguíneo em tecidos isquêmicos, a fim de evitar a morte celular por anóxia, causa o agravamento de lesões pré-existentes, fato este denominado lesão de reperfusão (FLAHERTY; WEISFELDT, 1988; ROWE; WHITE, 2002).

Entende-se por isquemia a redução ou interrupção do fluxo sanguíneo a determinados órgãos ou tecidos, constituindo uma das principais causas de lesão tissular (KUMAR et al., 2010; METZE, 1998). A gravidade destas alterações está diretamente relacionada à duração da isquemia (MATOS et al., 2000; LÓPEZ; OLIVELLA, 2009). Com o fluxo sanguíneo interrompido e, desta maneira, com redução ou interrupção de oferta de oxigênio, ocorrem alterações metabólicas e enzimáticas afetando, por exemplo, o metabolismo energético (EVORA et al., 1996; MATOS et al., 2000), e, por conseqüente, a síntese de adenosina trifosfato (ATP), determinando assim, o esgotamento de ATP intracelular e distúrbio da homeostase celular (MATOS et al., 2000; CERQUEIRA; HUSSNI; YOSHIDA, 2005).

Durante a isquemia, como a célula não consegue manter a síntese adequada de ATP, há degradação dos estoques existentes os quais são transformados, sequencialmente, em adenosina, inosina e hipoxantina (McMICHAEL; MOORE, 2004). O acúmulo destes compostos no interior da célula é responsável pela ocorrência de alguns dos fenômenos observados durante a reperfusão (McMICHAEL; MOORE, 2004). Adicionalmente, a célula utiliza a glicólise anaeróbica, uma via alternativa de produção de ATP, na tentativa de manter a homeostase celular, porém tal via energética gera ácido láctico e fosfatos inorgânicos, os quais diminuem o pH intracelular e inibem a síntese de ATP (MOORE; MUIR; GRANGER, 1995).

Em decorrência do déficit energético, é prejudicada a atividade das bombas de transporte iônico dependentes de energia, resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, a qual permite o influxo de cálcio e sódio e o efluxo de potássio (PEREIRA, 1998; PAGLIOSA, 2009; KUMAR et al., 2010). O acúmulo de cálcio intracelular ativa proteases, fosfolipase A₂ (PLA₂) e calpaína (Figura 1) (MATOS et al., 2000; PAGLIOSA, 2009). As proteases promovem a lise de proteínas estruturais e são responsáveis pela lesão celular direta, pois degradam a membrana celular, citoesqueleto e cromatina (ROWE; WHITE, 2002). As PLA₂ sintetizam o ácido araquidônico a mediadores inflamatórios que causam lesão celular (PINHEIRO et al., 1999) e, por fim a calpaína tem a incumbência de converter xantina desidrogenase (XDH) em xantina oxidase (XO) (MOORE; MUIR; GRANGER, 1995).

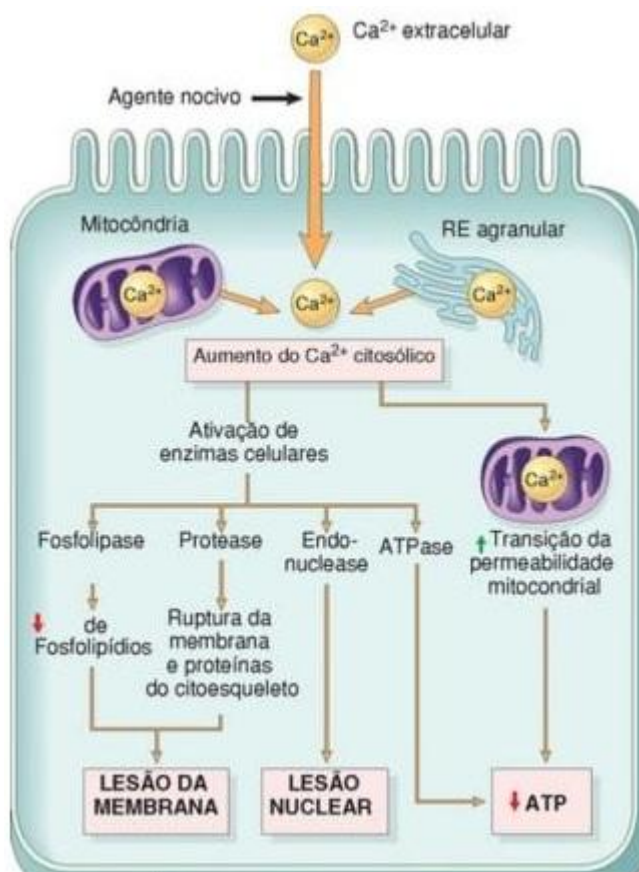


Figura 1. Esquema representativo do acúmulo de cálcio intracelular decorrente de lesão celular (KUMAR et al., 2010).

No decorrer do processo isquêmico há aumento na formação da xantina oxidase (XO) (McMICHAEL; MOORE, 2004). A importância desta enzima no agravamento da lesão de reperfusão se deve ao fato dela utilizar o oxigênio como aceptor de elétrons durante a transformação de hipoxantina em ácido úrico e ânion superóxido (O_2^-) (FORBES; COUGHLAN; COOPER, 2008). Mediante reperfusão do segmento ou redução da lesão proveniente do restabelecimento circulatório, os quais ocorrem diante da remoção da causa obstrutiva e ou compressão da parede intestinal, a xantina oxidase será ativada. O O_2^- , formado então em grande quantidade, pode reagir diretamente com os fosfolípidos e proteínas da membrana celular provocando fissuras na sua estrutura. Ademais, na mitocôndria o O_2^- pode ser convertido pela enzima superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ROWE; WHITE, 2002; McMICHAEL; MOORE, 2004; PORTH; SOMMER,

2011). Considerando a elevada concentração de ferro (Fe^{+}) presente em enzimas mitocondriais, como a citocromo oxidase, há elevado potencial de reação destes compostos, H_2O_2 e O_2^- , possibilitando a formação do radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), que é altamente reativo e citotóxico (Figura 2) (MATOS et al., 2000; ROWE; WHITE, 2002; McMICHAEL; MOORE, 2004; CERQUEIRA; HUSSNI; YOSHIDA, 2004).

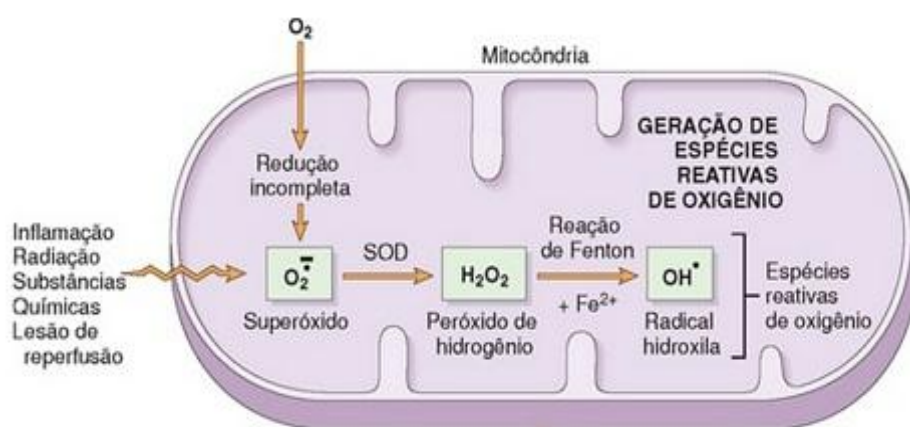


Figura 2. Esquema representativo da produção de espécies reativas de oxigênio (KUMAR et al., 2010).

Este cenário é responsável pelo agravamento das lesões que ocorrem após reperfusão do segmento afetado anteriormente por isquemia, seja esta total ou parcial. Além disso, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células endoteliais promove a ativação e atração de neutrófilos (Figura 3) (ROWE; WHITE, 2002; McMICHAEL; MOORE, 2004).

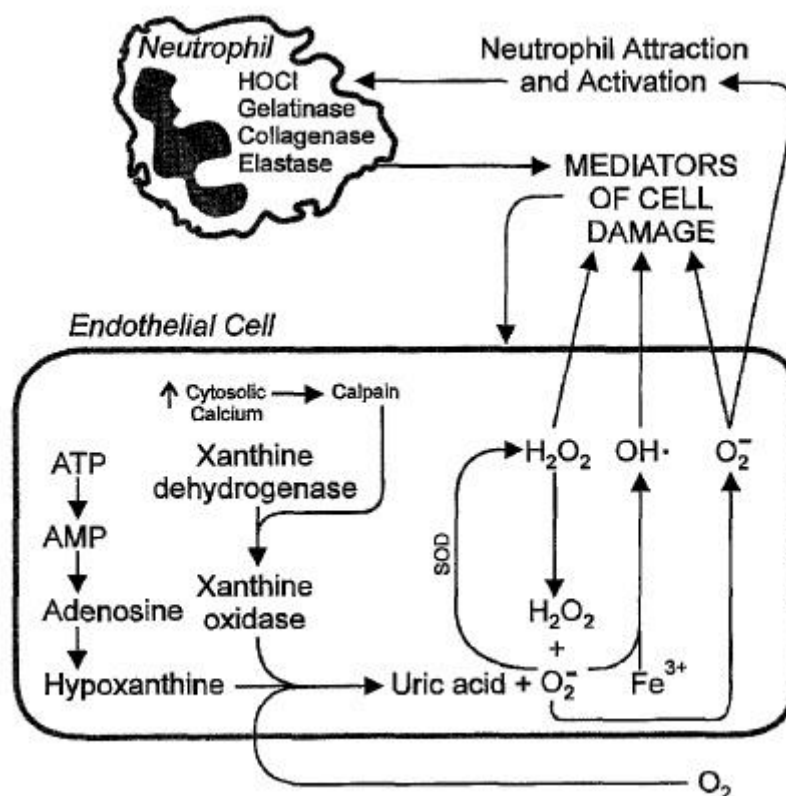


Figura 3. Esquema representativo dos eventos que ocorrem na célula durante lesão de isquemia e reperfusão (ROWE; WHITE, 2002).

As células endoteliais e os leucócitos são as células mais precocemente afetadas pela hipóxia (PINHEIRO et al., 1999). O endotélio, sob efeito da hipóxia, produz interleucina 1 (IL-1) e interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de agregação plaquetária (PAF), propiciando a migração, adesão e ativação leucocitária, além de aumento na permeabilidade vascular (FALLER, 1999; MICHIELS; ARNOULD; REMACLE, 2000). A hipóxia também induz a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) que gera tromboxanos e liberam citocinas. A integridade das células epiteliais que recobrem a mucosa intestinal é afetada pela hipóxia, pois a lesão do epitélio intestinal estimula as células epiteliais adjacentes a produzir citocinas, que por sua vez aumentam o recrutamento de neutrófilos e a permeabilidade vascular (BLINSKLAGER et al., 2007).

À medida que a membrana celular sofre lise, esta libera fosfolípidos entre os quais se inclui o ácido aracdônico. De outro lado, ao ativar a PLA₂, a hipocalcemia

intracelular, possibilita que a enzima regule a formação de lisofosfatidilcolina e fator de agregação plaquetária (MOORE; MUIR; GRANGER, 1995). O ácido araquidônico sintetiza eicosanóides, substâncias que atuam como mediadores inflamatórios, os quais, pela via da cicloxigenase (COX-2), produzem prostaglandinas e tromboxanos, enquanto pela via da lipoxigenase, produzem lipoxinas e leucotrienos. Tais substâncias são responsáveis por ativar plaquetas, leucócitos, células endoteliais e moléculas de adesão, que propiciam eventos inflamatórios, tal como, aderência, quimiotaxia, desgranulação leucocitária, agregação plaquetária e produção de radicais livres derivados de oxigênio (ROWE; WHITE, 2002).

As manifestações da resposta inflamatória aguda podem ser atribuídas às imediatas alterações vasculares e celulares que ocorrem devido à injúria (PORTH; SOMMER, 2011). As alterações vasculares se caracterizam por vasodilatação, que é induzida por diferentes mediadores, dentre os quais se incluem histamina e óxido nítrico, em seguida por aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de fluido rico em proteínas, para os tecidos extravasculares (KUMAR et al., 2010; PORTH; SOMMER, 2011). Devido à perda de líquido e diâmetro vascular aumentado, o fluxo sanguíneo se torna lento contribuindo para o deslocamento dos leucócitos para a periferia do lúmen vascular, processo chamado de marginação, iniciando assim as alterações, conforme ilustrado na Figura 4 (KUMAR et al., 2010; PORTH; SOMMER, 2011).

Em seguida ao efluxo de fluidos e vasodilatação, os leucócitos aderem transitoriamente ao endotélio em ação mediada pelas moléculas de adesão celular, por exemplo, pelas selectinas expressas nos leucócitos (L-selectina), no endotélio (E-selectina) e nas plaquetas e endotélio (P-selectina). Estas promovem a adesão frouxa dos leucócitos com as células endoteliais, produzindo movimento de rolamento sob pressão do fluxo sanguíneo (KUMAR et al., 2010; PORTH; SOMMER, 2010; ACKERMANN, 2013). A expressão das selectinas e seus ligantes são reguladas pelas citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e quimiocinas (citocinas quimioatraentes) (KUMAR et al., 2010).

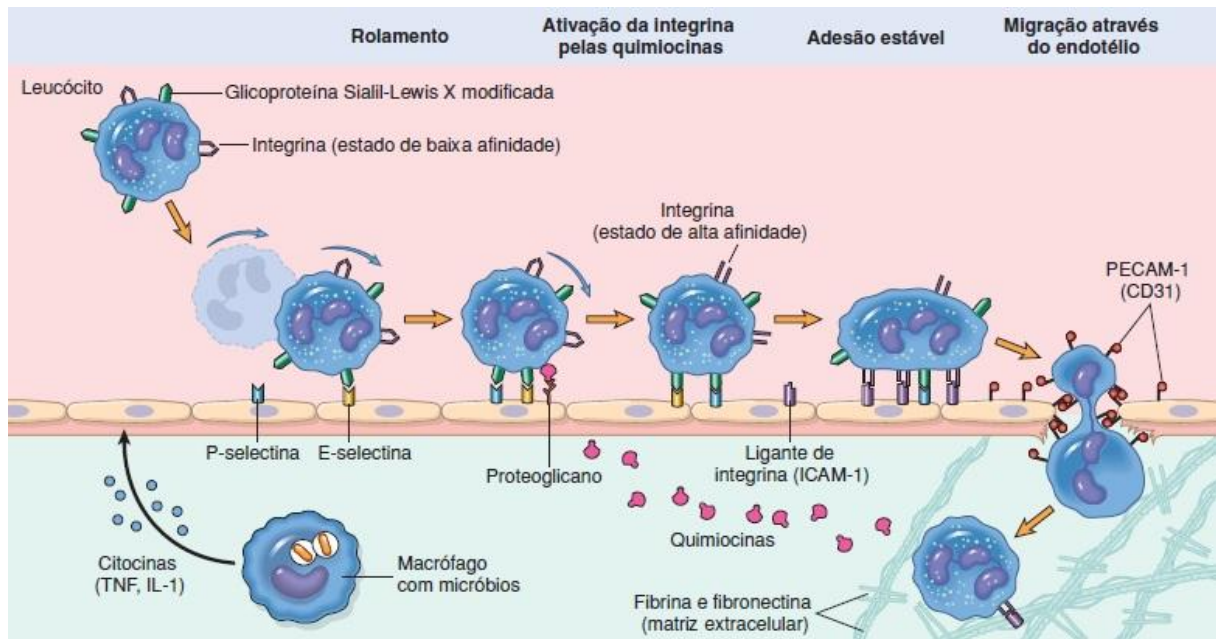


Figura 4. Esquema representativo das etapas da migração de neutrófilos ao longo dos vasos sanguíneos (KUMAR et al., 2010).

Subsequentemente, o processo evolui para adesão firme mediada por outras moléculas de adesão, tal como pelas integrinas nos leucócitos, principalmente a molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1) e as imunoglobulinas, por exemplo, a molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) nas células endoteliais (FRANCISCHETTI et al., 2010; KUMAR et al., 2010). Posteriormente, ocorre a transmigração ou diapedese dos leucócitos através dos espaços interendoteliais em direção ao local da injúria, sendo mediados pelas moléculas de adesão presentes nas junções intercelulares entre as células endoteliais, tal como a molécula de adesão de célula endotelial e plaquetas (PECAM-1) e moléculas de adesão juncionais (JAMs) (KUMAR et al., 2010; ACKERMANN, 2013).

Os leucócitos migram para os tecidos em direção ao local da injúria, devido ao processo denominado quimiotaxia. Na quimiotaxia algumas substâncias como os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas), fragmentos de complemento e citocinas (TNF e IL-1), possuem a capacidade de atrair e ativar os leucócitos para o foco da lesão (YOSHIDA, 1996; SILVEIRA; YOSHIDA, 2004; FRANCISCHETTI et al., 2010; KUMAR et al., 2010). Uma vez

ativados, os leucócitos liberam enzimas proteolíticas, que participam da lesão tecidual e destruição da matriz extracelular (JONES; HUNT; KING, 1997).

2.3 METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs)

As enzimas proteolíticas, endoproteinases ou peptidases, são classificadas em quatro tipos distintos de acordo com seu mecanismo catalítico, a saber, serinaprotease, cisteínaprotease, aspartilprotease e metaloprotease (BARRET; SAKLATVALA, 1985). As metaloproteinases de matriz são denominadas, atualmente, como um grupo constituído de 26 endopeptidases cálcio (Ca^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) dependentes, sendo responsáveis pela degradação e remodelamento dos mais diversos componentes da matriz extracelular, dentre eles, colágeno intersticial, gelatina, agrecano, elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanos (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; CLEGG et al., 1997; CLEGG; JONES; CARTER, 1998; NAGASE; WOESSNER, 1999; SOUZA; LINE, 2002; CHEONG et al., 2003; PARKS, WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004; MEDINA et al., 2004; AROSALO et al., 2007; FOSQUIERA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011; ASAWAKARN; ASAWAKARN, 2012; GALEGUILLLOS; CARRILLO; FLORES, 2013).

Tais enzimas estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos como morfogênese, embriogênese, angiogênese, ovulação, cicatrização de feridas, desenvolvimento dentário, migração celular, assim como, em determinados eventos patológicos como neoplasia, doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, osteoartrite, diabetes, nefrite, enfermidade periodontal, isquemia, necrose e inflamação local, entre outros (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; AROSALO et al., 2007; PAGE McCRAW; EWALD; WERB, 2007; FOSQUIERA et al., 2009; ASAWAKARN; ASAWAKARN, 2012; GALLEGUILLLOS; CARRILLO; FLORES, 2013).

Em condições fisiológicas, a atividade proteolítica da metaloproteinase normalmente esta presente em nível baixo e na forma de zimogênio (MEDINA; RADOMSKI, 2006; NISSINEN; KÄHÄRI, 2014), e quando ativadas são responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular, no entanto em situações patológicas tais

enzimas ativas são controladas pelos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) (MEDINA; RADOMSKI, 2006).

Todas as MMPs possuem estrutura molecular similar (Figura 5) a qual é constituída de quatro domínios, entre eles, um peptídeo de sinal hidrofóbico para a secreção; um domínio pró-peptídeo que mantém a latências destas enzimas; um domínio catalítico que contém o sítio de ligação ao zinco altamente conservado e, por fim, um domínio “hemopexin-like” C-terminal que permanece ligado ao domínio catalítico por uma dobradiça flexível, por isso esta região encontra-se intimamente implicado no reconhecimento específico do substrato (VISSE; NAGASE, 2003; PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004; MEDINA et al., 2004; RA; PARKS, 2007), na ligação com os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS) e na ativação das MMPs (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

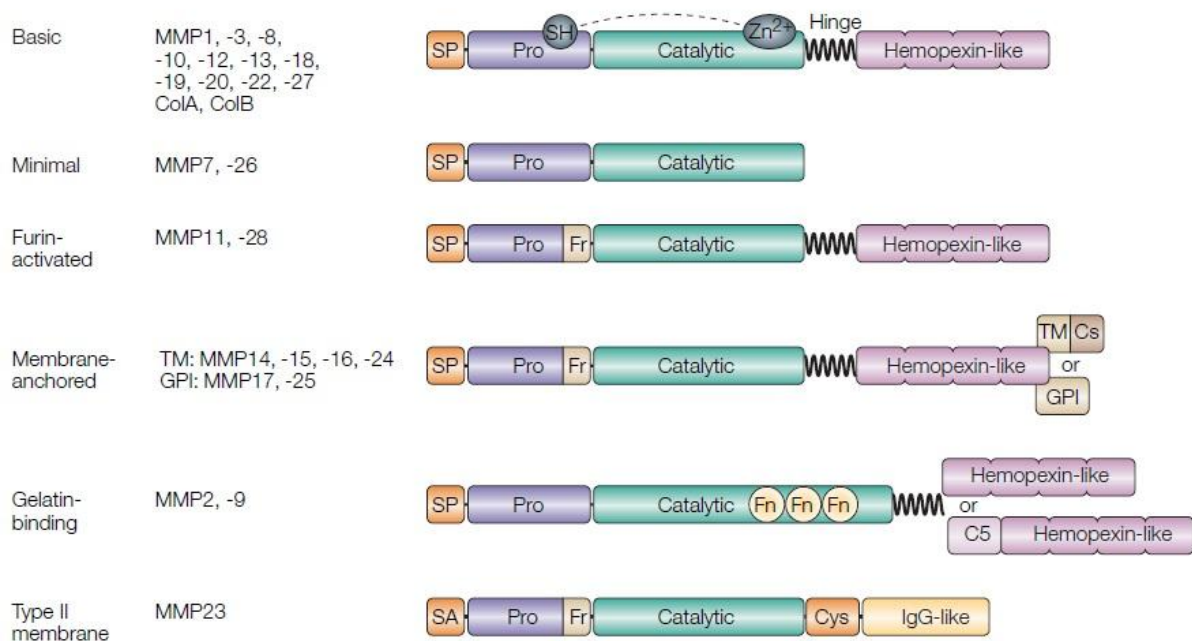


Figura 5. Esquema representativo da estrutura dos domínios das metaloproteinases de matriz (PARKS, WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004).

A classificação das MMPs é realizada conforme seu domínio catalítico, organização estrutural e, principalmente, de acordo com o substrato específico de degradação, portanto, são subdivididas em seis grupos: collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e

MMP-11), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), metaloproteinases tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24) e outras (MMP-12, 19, 20, 21, 22, 23, 27 e 28), como exposto na Figura 6 (WOESSNER, 1991; HIDALGO; ECKHARDT, 2001; VISSE; NAGASE, 2003; FOSQUIERA et al., 2009, JÚNIOR et al., 2015).

Enzima	MMP
COLAGENASE	
Colagenase-1	MMP-1
Colagenase-2	MMP-8
Colagenase-3	MMP-13
Colagenase-4	MMP-18
GELATINASES	
Gelatinase A	MMP-2
Gelatinase B	MMP-9
ESTROMELISINA	
Estromelisina-1	MMP-3
Estromelisina-2	MMP-10
Estromelisina-3	MMP-11
MATRILISINA	
Matrilisina-1	MMP-7
Matrilisina-2	MMP-26
MMP-TIPO MEMBRANA	
MMP-MT1	MMP-14
MMP-MT2	MMP-15
MMP-MT3	MMP-16
MMP-MT5	MMP-24
OUTROS	
	MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21 MMP-23, MMP-27, MMP-28

Figura 6. Principais grupos das metaloproteinases de matriz com suas respectivas nomenclaturas (adaptada de VISSE; NAGASE, 2003).

As gelatinases são MMPs que apresentam diferenças, posto que possuem um domínio de ligação ao colágeno (CBD), composto de três repetições de fibronectina do tipo II que se ligam a gelatina, colagenase e laminina (Figura 7) (ALLAN et al., 1995; NAGASE; WOESSNER, 1999; PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004; RA; PARKS, 2007; BAUVOIS, 2012).

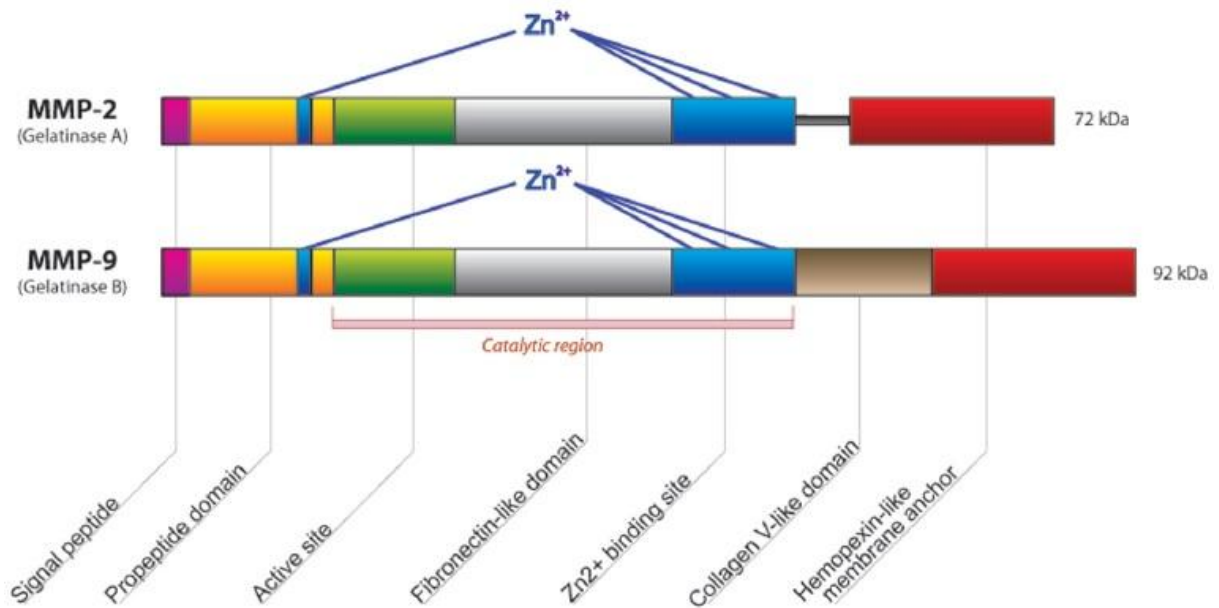


Figura 7. Esquema representativo da estrutura de MMP-2 e MMP-9 (TVEITA; REKVIING; ZYKOVA, 2008).

As MMPs são sintetizadas e secretadas na forma latente, ou seja, como pró-enzimas também cognominada como zimogênios, por conseguinte, sua ativação ocorre no ambiente pericelular, por intermédio da fragmentação da ligação entre o grupo cisteína no domínio pró-peptídeo com o Zn^{2+} no domínio catalítico, promovendo assim a perda de um peptídeo de aproximadamente 10kDa de peso molecular (WOESSNER, 1998; HIDALGO; ECKHARDT, 2001; VISSE; NAGASE, 2003; NAVARRO et al., 2006; GALLEGUILLOS; CARRILLO; FLORES, 2013).

No grupo das gelatinases encontram-se as MMP-2 e MMP-9, sendo denominadas, respectivamente, como gelatinase A e B. A próMMP-2 possui peso molecular de 72kDa e a próMMP-9 de 92kDa (FRIDMAN et al., 1992; PIRILÄ et al., 2001) enquanto que, as formas ativas, de MMP-2 possuem peso de 65kDa e a MMP-9 de 82kDa (BAUVOIS, 2012). Estas enzimas são capazes de degradar principalmente colágeno tipo IV e gelatina (WOESSNER, 1991; VISSE; NAGASE, 2003).

De acordo com Woessner (1991), as células responsáveis pela produção de MMPs são os leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos,

fibroblastos, células mesenquimais, além de células tumorais. A atividade catalítica das MMPs é regulada em quatro níveis: (1) pela transcrição nos genes das MMPs; (2) ativação e inativação de tais enzimas; (3) pelo controle das diferenças de especificidade de substrato e (4) pelos inibidores de MMPs (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; RA; PARKS, 2007; CLUTTERBUCK et al., 2010). Deve-se ressaltar que, em geral, as MMPs não são expressas em tecidos saudáveis (PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004) ou seus níveis podem ser muito baixos e até mesmo indetectáveis (SHAPIRO; SENIOR, 1999; HIDALGO; ECKHARDT, 2001), enquanto que em processos de reparação ou remodelamento, tecidos doentes ou inflamados e em tipos de célula cultivadas em cultura pode-se detectar a expressão das MMPs (PARKS, WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004).

Os inibidores teciduais endógenos de metaloproteinases (TIMPs), são moléculas de peso molecular variando de 21 a 30kDa, dos quais já foram identificados quatro TIMPs em vertebrados (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) e possuem como principal característica o fato de bloquearem as MMPs unindo-se ao íon zinco e, consequentemente, inativando as MMPs (VISSE; NAGASE, 2003; CLUTTERBUCK et al., 2010), sendo que o equilíbrio entre MMPs e TIMPs contribui para a homeostase da matriz extracelular, de maneira oposta pode colaborar no processo patológico de diversas enfermidades (SHAPIRO; SENIOR, 1999).

A técnica de zimografia é descrita como um ensaio simples, sensível, funcional e capaz de detectar e quantificar formas ativas e latentes das MMP (LEBER; BALKWILL, 1997; SNOEK VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005). Trata-se de uma técnica de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, para detecção da atividade enzimática, a qual por meio de corrente elétrica permite a migração e separação das MMPs pela diferença do peso molecular (WOESSNER, 1998; KUPAI et al., 2010).

Atualmente, na medicina equina há inúmeros trabalhos sobre a expressão das metaloproteinases. Riley et al. (2004) observaram que ambas metaloproteinases (2 e 9) estavam presentes no fluido folicular durante desenvolvimento folicular de éguas, porém o predomínio entre as gelatinases detectadas foi da MMP-2. Raulo et al. (2001), documentaram aumento significativo na atividade de MMP-9 em amostras

de secreções respiratórias de cavalos com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) quando comparados com cavalos saudáveis, enquanto a expressão da MMP-2 não desempenha papel importante na doença pulmonar crônica.

Já Ollivier et al. (2004) evidenciaram, inicialmente, níveis significativamente elevados de MMP-2 e MMP-9 no filme lacrimal de equinos com ceratite ulcerativa, contudo a medida que tratamentos médicos e cirúrgicos foram instituídos houve diminuição da atividade proteolítica. Fietz et al. (2008) confirmaram que a atividade de MMP-2 e MMP-9 no líquido sinovial foram elevados em equinos com doença articulares.

Em pesquisa conduzida por Kidd et al. (2007), utilizando-se líquido sinovial de equinos verificou-se altos níveis de MMP-2 e MMP-9 nos animais com artrite séptica, quando comparados aos saudáveis. Canello (2013), ao avaliar as alterações no tecido laminar podal, por meio de técnica zimográfica detectou a presença das formas latentes de MMP-2 e 9 e a forma ativa de MMP-2.

Há estudos realizados no endométrio de éguas saudáveis e portadores de endometriose crônica (PORTO et al., 2011), endometriose (ARESU et al., 2012), sarcóide equino (MOSSERI et al., 2014), líquido sinovial de equinos com osteoartrite (SIMONE et al., 2015), dentre outros.

Ademais, numerosas investigações sugerem o envolvimento das MMPs como um dos fatores que contribuem na patofisiologia de várias desordens inflamatórias intestinais (NAITO; YOSHIKAWA, 2005; MEDINA; RADOMSKI, 2006; SILOŞI et al., 2014, BASS et al., 2015), uma vez que tais enzimas podem ser liberadas pela maioria das células do tecido conjuntivo presentes no intestino, em resposta a estímulos inflamatórios (MEDINA; RADOMSKI, 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental realizado no presente estudo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp – Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 007568-09).

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados oito equinos, sem raça definida, quatro machos e quatro fêmeas, adultos, com idade média entre oito e quatorze anos. Antecedendo o período experimental, os animais foram pesados e examinados clinicamente, com o propósito de avaliar a higidez, utilizando-se apenas animais sadios. Os equinos apresentaram escore corporal bom e foram submetidos a programas de desverminação¹ e controle de ectoparasitas². Os animais foram mantidos em baias individuais, nas dependências do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” e mantidos com alimentação diária equivalente a 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*.

3.2. EXAME FÍSICO

Os animais foram submetidos a exames físicos, iniciando-se pela auscultação cardiopulmonar, a fim de mensurar a frequência cardíaca (determinada em batimentos por minuto, bpm) e respiratória (estipulado em movimentos por minuto, mpm); determinação da temperatura retal (em graus Celsius, T_R) utilizando-se de termômetro clínico de bulbo de mercúrio e avaliação do turgor cutâneo (em segundos) por meio de pregueamento da pele, na região lateral do pescoço, classificada em normal, leve, moderada e grave. Sucessivamente, avaliou-se a perfusão das mucosas, classificando de acordo com a coloração, a citar, normocorada, pálida, ictérica, cianótica ou hiperêmica; e de acordo com a

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

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

determinação do tempo de preenchimento capilar (TPC), por meio de compressão digital na mucosa gengival, observando o tempo, em segundos, de retorno à coloração anterior.

Logo depois, prosseguiu-se com a verificação da motilidade intestinal, classificada em ausente (-), hipomotilidade (+), motilidade normal (++) e hiperomotilidade (+++), por meio de auscultação abdominal, nos quatro quadrantes abdominais, sendo eles, ventrais direito/esquerdo e dorsais direito/esquerdo, para determinar a presença ou não de borboríngos. E finalmente aferição do pulso arterial digital palmar, classificado como ausente ou presente. Os exames físicos foram realizados imediatamente antes do procedimento cirúrgico e, posteriormente, a cada 12 horas, até atingir 72 horas após a cirurgia. Sinais clínicos característicos referentes a desconforto abdominal também foram avaliados ao longo dos dias.

3.3 CUIDADOS PRÉ-CIRÚRGICOS

No dia que antecedeu o procedimento cirúrgico, os animais foram tricotomizados na região abdominal ventral, sobre a linha branca, delimitadas crânio-caudalmente pela cartilagem xifoide e osso púbis e, dorso-ventralmente, pela região paramediana ventral esquerda e direita. A fim de auxiliar nas colheitas de sangue, administração de medicamentos e hidratação nos períodos pré, trans e pós-cirúrgico, foi realizado a cateterização da veia jugular esquerda mediante inserção de cateter mono lúmen³ 14 G x 20 cm, em sentido caudal, ou seja, seguindo o fluxo sanguíneo. Posteriormente à colocação do cateter, foram colhidas amostras basais (M0) de sangue e de líquido peritoneal, descritas nos itens 3.7 e 3.8. Logo em seguida, os equinos foram realocados nas baias e mantidos em jejum alimentar e hídrico de 24 e 12 horas, respectivamente.

3.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

Inicialmente, a medicação pré-anestésica incluiu a sedação dos animais com a administração intravenosa de cloridrato de detomidina 10%⁴ (0,015 mg/kg).

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

⁴ Dormium V®, Agener União Saúde Animal - Embu-Guaçu, SP, Brasil

Decorridos 10 minutos, realizou-se indução anestésica por meio da administração de cetamina 10%⁵ (2,0 mg/kg) a qual seguiu a administração de maleato de midazolam⁶ (0,1 mg/kg), todos por via intravenosa (IV), levando o animal ao decúbito lateral esquerdo. Imediatamente após, efetuou-se a intubação orotraqueal, e o posicionamento do animal em decúbito dorsal, sobre a mesa cirúrgica.

A anestesia inalatória foi mantida com isoflurano⁷ vaporizado em oxigênio, em circuito semi-fechado, sob ventilação mecânica controlada. Durante todo o procedimento cirúrgico, administrou-se dobutamina⁸ (0,002 mg/kg/min) associado à solução de Ringer com Lactato⁹ em infusão contínua, com o propósito de manter a pressão arterial média (PAM), entre 70 e 100mmHg. E para a manutenção da volemia, realizou-se a administração de 5% do peso corpóreo de solução de Ringer com Lactato¹⁰ por dia até completar 72 horas de pós-cirúrgico.

3.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Realizou-se criteriosamente a antisepsia do campo cirúrgico com polivinilpirrolidona-iodo tópico a 1%. Em seguida, efetuou-se celiotomia por meio de incisão mediana pré-umbilical de aproximadamente 20 cm de comprimento com a finalidade de localizar e exteriorizar o cólon menor, sendo o mesmo isolado do campo cirúrgico por meio de compressas estéreis. Nos segmentos que foram manipulados obteve-se o cuidado de remover manualmente, por meio de ordenha, todo o conteúdo intestinal, em sentido aboral. Com a finalidade de manter o segmento intestinal aquecido este foi, frequentemente, irrigado durante o trans-cirúrgico, com solução de Cloreto de Sódio 0,9% a 37°C. A escolha do segmento para promover obstrução intraluminal foi realizada observando-se a presença de ramos da artéria mesentérica que irrigam esta região (Figura 8A).

Definido o local a ser obstruído, identificou-se as porções oral e aboral do cólon menor. Posteriormente, realizou-se incisão na borda anti-mesentérica, na

⁵ Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda - Cotia, SP, Brasil

⁶ Dormonid®, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. - Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁷ Isoforine®, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. - Itapira, SP, Brasil

⁸ Cloridrato de dobutamina, NovaFarma Indústria Farmacêutica - Anápolis, Go, Brasil

⁹ JP Indústria Farmacêutica S.A. - Ribeirão Preto, SP, Brasil.

¹⁰ JP Indústria Farmacêutica S.A. - Ribeirão Preto, SP, Brasil.

porção aboral ao segmento a ser distendido. Através deste orifício, um balão¹¹ (Figura 8B), com diâmetro de 13 cm, estéril e desinflado foi introduzido no lúmen do cólon menor em sentido oral (Figura 8C). Após o posicionamento adequado, este foi insuflado com ar até atingir a pressão de 80 mmHg, aferida por meio de esfigmomanômetro. Com o balão já insuflado, realizou-se a enterorrafia da incisão com fio de poliglactina 910 n° 2-0¹² (Figura 8D). Em seguida, o segmento intestinal foi realocado na cavidade abdominal e a incisão da mesma foi reduzida utilizando-se pinças de Allis.

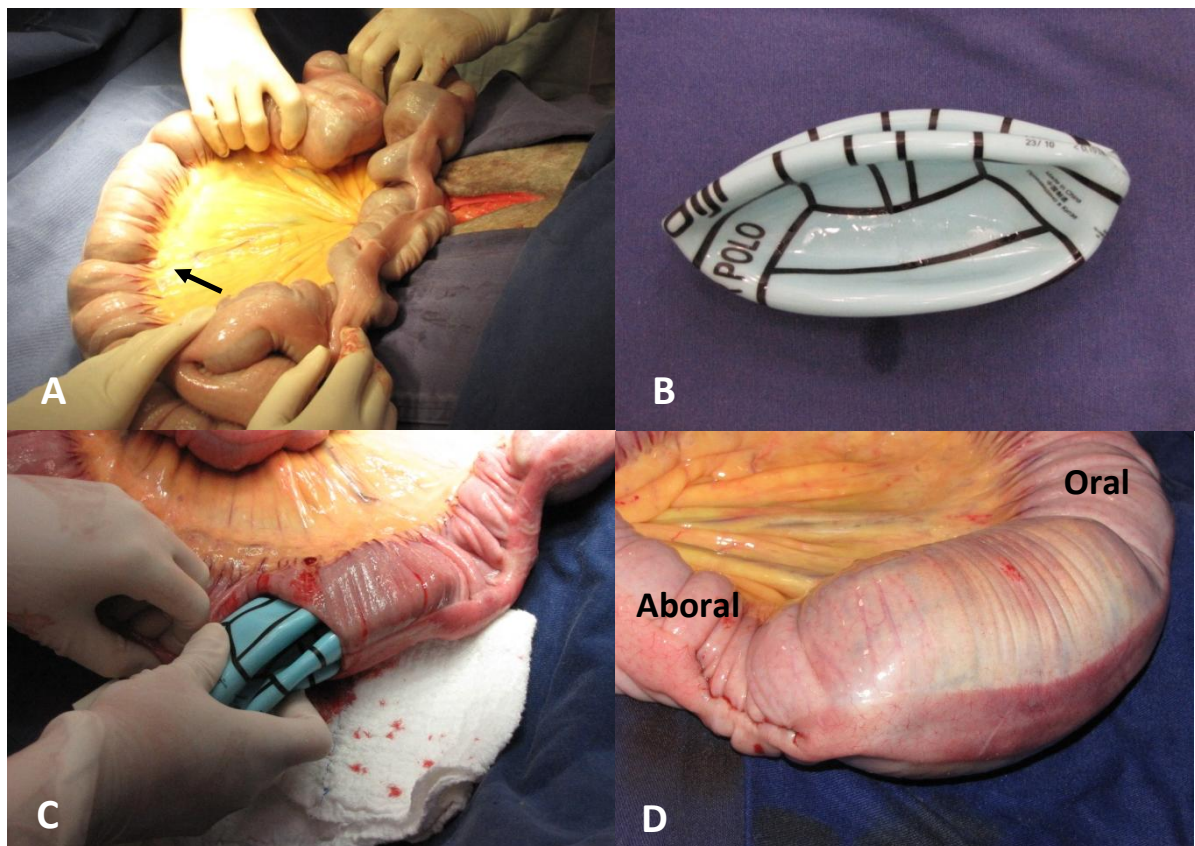


Figura 8. Imagem fotográfica durante o procedimento de celiotomia, para obstrução do cólon menor em equino. (A) Determinação do segmento a ser manipulado, com observação dos ramos das artérias mesentéricas (seta). (B) Balão estéril utilizado para promover obstrução não estrangulativa do cólon menor. (C) Introdução do balão de látex no lúmen do colón menor. (D) Balão posicionado e inflado no lúmen do segmento do cólon menor.

¹¹ Water Polo Nabaiji

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

Os animais foram mantidos em decúbito dorsal, sob anestesia inalatória, durante o período de quatro horas. Desta maneira, imediatamente, após este período o segmento do cólon menor foi novamente exposto para remoção do balão. Com isso, realizou-se nova incisão na porção anti-mesentérica, com o objetivo de perfurar o balão. Ato contínuo houve seu completo esvaziamento, prosseguido de sua remoção do lúmen intestinal, através da incisão citada anteriormente.

A enterorrafia foi realizada com fio de poliglactina 910 n° 2-0 em dois planos, Schimieden seguido de Cushing. A linha alba foi suturada juntamente com o peritônio em padrão Sultan empregando-se fio de nylon 0,60 agulhado com agulha 40x12¹³. O tecido subcutâneo foi aproximado com sutura contínua padrão "zig-zag" com fio de poliglactina 910 n° 0¹⁴, e a dermorrafia foi realizada em padrão Wolff, também com fio nylon 0,60 agulhado com agulha 40x12. Ao término, realizou-se curativo na sutura de pele com gaze estéril mediante proteção com fita adesiva de polietileno reforçado com tecido de algodão¹⁵. Imediatamente após, os animais foram retirados do centro cirúrgico e acomodados em sala de recuperação anestésica, emborrachada, objetivando minimizar eventualidades no momento do retorno da anestesia.

3.6. CUIDADOS PÓS-CIRÚRGICOS

Ao longo do período pós-cirúrgico, os equinos receberam ceftiofur sódico¹⁶ (2,2 mg/kg a cada 12 horas por via intravenosa), cloridrato de tramadol¹⁷ (1,1 mg/kg a cada seis horas, dividindo-se equitativamente o volume determinado em administração por via intravenosa e por via intramuscular) e o butilbrometo de escopolamina¹⁸ (0,2 mg/kg a cada 6 horas por via intravenosa) durante três dias consecutivos após a celiotomia. Os curativos das feridas cirúrgicas foram realizados a cada 12 horas com polivinilpirrolidona-iodo tópico a 1%, até completarem 72 horas.

¹³ Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda. - Curitiba, PR, Brasil

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

¹⁵ Silver Tape®, 3M, Sumaré, SP, Brasil.

¹⁶ Minoxel 8G®, Lapisa, S.A. de C.V. - Guadalajara, Mexico

¹⁷ Tramal®, Laboratórios Pfizer Ltda. - Guarulhos, SP, Brasil

¹⁸ Buscopan®, Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda. - Itapeirica da Serra, SP, Brasil

Durante todo o período pós-cirúrgico os animais foram alimentados com capim fresco, feno de tifton e água à vontade.

3.7 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO SANGUE VENOSO

As colheitas das amostras de sangue venoso foram obtidas a partir do cateter implantado na veia jugular esquerda em todos os momentos experimentais, por conseguinte, no período que antecedeu a indução anestésica (M0), no momento em que o balão foi desinflado (M4) e, posteriormente, a cada 12 horas (M12, M24, M36, M48, M60) até completar 72 horas pós-cirurgia (M72). As amostras foram colhidas em tubos de coleta a vácuo contendo anticoagulante EDTA¹⁹, para a análise eritroleucométrica.

Especificadamente, durante os momentos M0, M4 e M72, foram colhidas amostras de sangue total, as quais foram armazenadas em frascos de coleta a vácuo contendo anticoagulante heparina sódica²⁰. Posteriormente, estas amostras foram processadas e alocadas em criotubos e congeladas a -70°C, a fim de avaliar a expressão das MMPs.

3.8 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO LÍQUIDO PERITONEAL

Para a análise da celularidade do líquido peritoneal, amostras foram colhidas em todos os momentos experimentais citados anteriormente. Todavia, para avaliar a expressão das MMPs, colheu-se amostras em três momentos distintos, a citar: no dia que antecedeu o procedimento de obstrução intraluminal do cólon menor (M0), ao término de 4 horas de obstrução intraluminal (M4) e após 72 horas ao fim do procedimento cirúrgico (M72). Deve-se enfatizar que, todo o procedimento foi realizado mediante rigorosa antisepsia e com a utilização de luvas estéreis, visando diminuir o risco de contaminação da cavidade.

Para a colheita do líquido peritoneal, em M0 e M72, foi realizada a paracentese abdominal segundo a técnica de Feitosa (2004). Com o auxílio de cânula mamária de bovino, após pequena incisão de pele e musculatura sobre a linha alba (Figura 9A), aproximadamente, seis centímetros caudal ao processo

¹⁹ BD Vacutainer® EDTA K₂ – BD, São Paulo, SP, Brasil.

²⁰ BD Vacutainer® Heparina Sódica, BD, São Paulo, SP, Brasil.

xifoide, colheu-se o líquido peritoneal em frascos estéreis distintos, um contendo EDTA para a análise de celularidade e o outro tubo contendo anticoagulante heparina sódica, para avaliação da expressão de MMPs (Figura 9B). No que se refere ao M4, à colheita foi obtida através da incisão cirúrgica (Figura 9C) com o auxílio de sonda uretral descartável número 14²¹ acoplada em seringa de 20mL (Figura 9D).

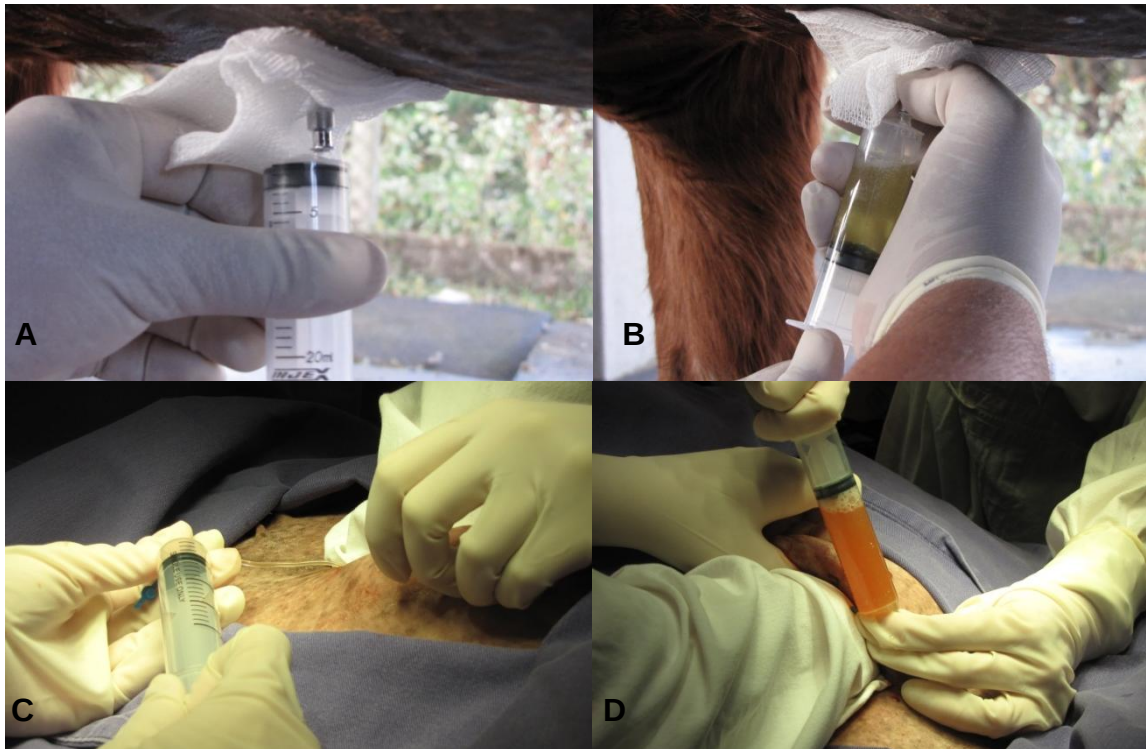


Figura 9. Abdominocentese em equino submetido à obstrução intraluminal do cólon menor. (A) Obtenção do líquido peritoneal (LP) com auxílio da cânula mamária acoplada à seringa, com animal mantido em posição quadrupedal. (B) Obtenção de LP em M0. (C) Obtenção do LP através da incisão cirúrgica, com auxílio de sonda uretral, com o animal mantido em decúbito dorsal. (D) Obtenção de LP em M4.

²¹Sonda uretral nº14 RG PVC. Embramed. Jurubatuba, SP, Brasil.

3.9 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

3.9.1 Avaliação eritroleucométrica e citológica do líquido peritoneal

De cada amostra colhida com anticoagulante EDTA, foram avaliadas a contagem de hemácias e leucócitos totais, teor de hemoglobulina, hematócrito e plaquetas em contador de células automático²². As contagens diferenciais dos leucócitos 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 realizados no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

3.9.2 Análises zimográfica de MMP-2 e MMP-9

As análises zimográficas foram realizadas no Laboratório de Patologia Aplicada – LAPap, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, sob orientação da Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado.

As amostras de plasma e líquido peritoneal foram centrifugadas a 12.000 x g, durante 15 minutos a 4°C. Imediatamente, o sobrenadante foi retirado e transferido para outro microtubo para que fosse realizado a quantificação proteica. Salienta-se que, todo o procedimento para extração das proteínas foi realizado a 4°C, sobre cuba de gelo e sala climatizada.

Posteriormente, tais amostras foram submetidas à quantificação das proteínas, pelo método do ácido bicinconínico, por meio de kit comercial²³, utilizando-se uma placa para microtitulação tipo ELISA, contendo cinco pontos para a curva padrão (200µg/mL, 400µg/mL, 600µg/mL, 800µg/mL e 1000µg/mL de albumina sérica bovina - BSA), seguindo recomendações do fabricante. Logo após, a placa foi incubada em estufa a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, analisada em espectrofotômetro com absorbância de 562 nm (540-590 nm). A concentração de proteínas foi estimada em µg/mL, por meio de equação de regressão. As

²² Pock-100iV Diff®, Sysmex do Brasil Indústria e Comércio Ltda. São José dos Pinhais, PR, Brasil.

²³ Pierce BCA Protein Assay Reagent. Pierce Biotechnology, EUA.

atividades gelatinolíticas das amostras foram detectadas pelo método de zimografia descrita por Machado et al. (2010) (Apêndice 1).

Os géis foram fotografados com alta resolução, utilizando-se foto documentador, que forma imagens de tamanho e qualidade padronizada. Posteriormente, as imagens dos géis foram analisadas utilizando-se o software ImageJ²⁴, com o método da densidade integrada, por isso expresso em unidades arbitrárias.

3.10 Análises Estatísticas

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

As variáveis foram analisadas segundo delineamento em blocos casualizados do programa computacional GraphPad Prism 6. Os métodos estatísticos empregados para avaliar a expressão de MMPs em sua forma ativa e/ou latente, detectadas no plasma e líquido peritoneal, durante os três momentos experimentais foram o teste Friedman seguido da aplicação do teste de Dunn. Para todas as análises realizadas estabeleceu-se o nível de significância igual a $p < 0,05$.

²⁴ Image processing and analysis in Java. National Institutes of Health, EUA.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros Clínicos

Os valores referentes a frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal, os quais são possíveis observar diferenças significativas, das variáveis clínicas ao longo do período experimental se encontram na Tabela 1 e Figura 10.

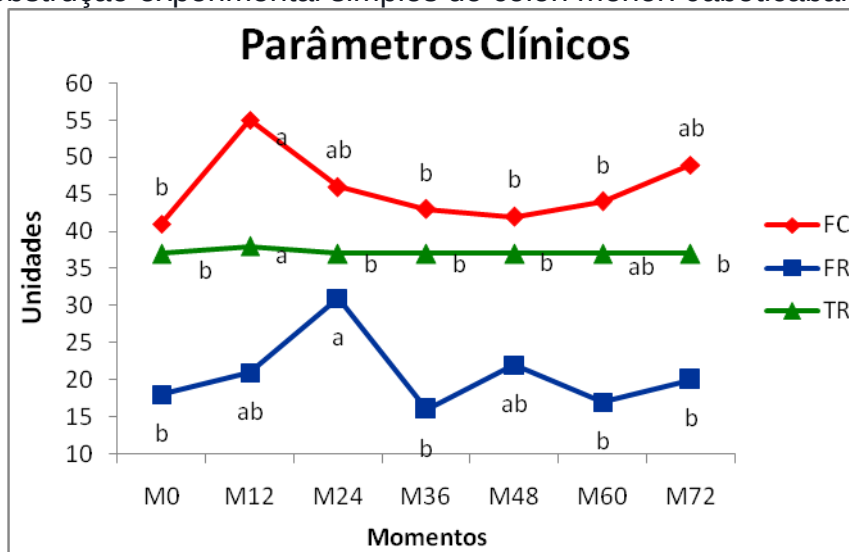
Com relação à FC, pode-se notar que houve aumento ($p \leq 0,05$) após 12 horas do término do procedimento cirúrgico (M12). Ao analisar a FR, constatou-se elevação ($p \leq 0,05$) em M24. Em todo o período experimental observou-se que a T_R aumentou ($p \leq 0,05$) apenas em M12.

Tabela 1. Médias ($\pm$ EPM) das variáveis clínicas de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (T_R) de equinos submetidos à obstrução experimental simples do cólon menor. Jaboticabal, 2015.

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

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

Figura 10. Evolução das variáveis clínicas de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (T_R) de equinos submetidos à obstrução experimental simples do cólon menor. Jaboticabal, 2015.



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 ($p>0,05$).

No que concerne ao TPC, a motilidade intestinal, o turgor cutâneo, a coloração de mucosa e o pulso das artérias digital palmares não houve diferenças ($p\leq 0,05$) em relação ao basal. Durante o período experimental a motilidade intestinal apresentou alterações, desta forma houve diminuição ($p>0,05$) após 12 horas de cirurgia (M12) a qual retornou aos valores basais após 60 horas de desobstrução do cólon menor (M60).

4.2 Avaliação Hematológica

Em relação à porção eritrocitária e ao plaquetograma do hemograma é possível observar que houve diferenças significativas, conforme explicitado na Tabela 2.

Deve-se destacar que, quatro horas após a obstrução intestinal (M4) houve diminuição ($p\leq 0,05$) do número de hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e plaquetas (Plaq), ao se comparar com os valores do momento basal. Posto isto, em M12 ocorreu aumento ($p\leq 0,05$) das variáveis citadas anteriormente quando comparadas a M4, porém tais valores não diferiram do momento basal.

No entanto, após 48 horas de desobstrução do cólon menor (M48), as variáveis He, Hb e Ht alcançaram seus menores valores quando comparados aos demais momentos referentes ao período de reperfusão, diferindo ($p \leq 0,05$) dos valores em M12.

Tabela 2. Médias ($\pm$ EPM) das variáveis hematológicas sanguíneas de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor. Jaboticabal, 2015.

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

He – Hemácias ($\times 10^9/\mu\text{L}$); Hb – hemoglobina (g/dL); Ht – hematócrito (%); Plaq – plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ($p > 0,05$).

A análise da Tabela 3 e Figura 11 indica que a contagem total dos leucócitos se elevou ($p \leq 0,05$) em M12 e M24. Todavia entre M36 e M72 a resposta leucocitária retornou aos valores basais. Desta maneira houve redução ($p \leq 0,05$), nos momentos finais do período de reperfusão, quando comparados ao M12. Em relação aos eosinófilos houve diminuição ($p \leq 0,05$) em M12, M24 e M36, enquanto nos demais momentos avaliados seus valores não diferiram do basal.

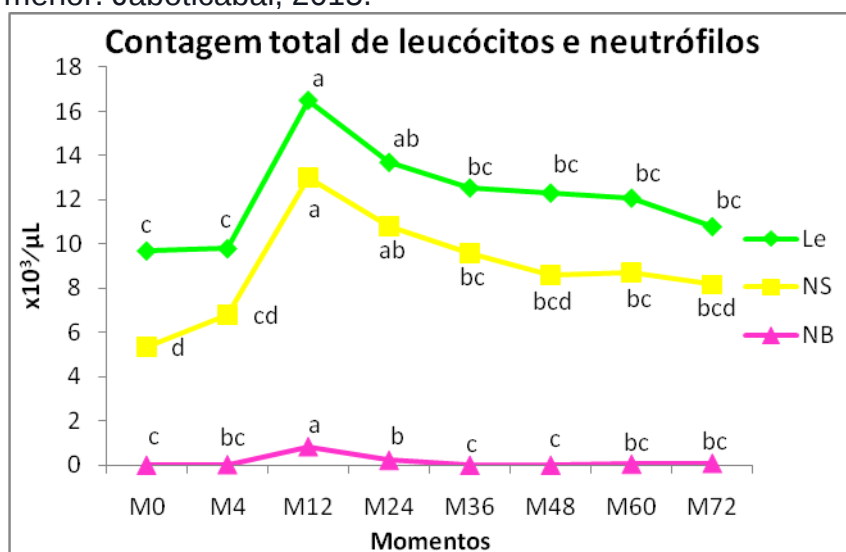
Dentre os momentos experimentais verificou-se que os bastonetes aumentaram ($p \leq 0,05$) somente em M12 e M24, em relação ao basal. Os valores dos neutrófilos segmentados aumentaram ($p \leq 0,05$) entre M12 e M36 comparando-se com o valor basal. Por sua vez, diante dos momentos estudados os valores referentes aos linfócitos registraram diminuição ($p \leq 0,05$) em M4, M12, M24, M36 e M60, em referência ao basal. Neste estudo, os valores referentes aos basófilos e monócitos não houve diferenças significativas.

Tabela 3. Médias ($\pm$ EPM) das variáveis leucocitárias sanguíneas de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor. Jaboticabal, 2015.

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

Le – leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$); NB – neutrófilos bastonetes ($\times 10^3/\mu\text{L}$); NS – neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$); Lin – linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ($p>0,05$).

Figura 11. Evolução na contagem de leucócitos totais e diferencial séricos de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor. Jaboticabal, 2015.



Le – leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$); NB – neutrófilos bastonetes ($\times 10^3/\mu\text{L}$); NS – neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ($p>0,05$).

4.3 Avaliação do Líquido Peritoneal

De acordo com a Tabela 4, é possível observar que as hemácias, hemoglobina e hematócrito aumentaram ($p\leq 0,05$) nos momentos quatro (M4) e 12 horas (M12) após o procedimento cirúrgico, em relação aos valores basais. Sobre a porção leucocitária (Tabela 4), destaca-se o aumento ($p\leq 0,05$) da resposta

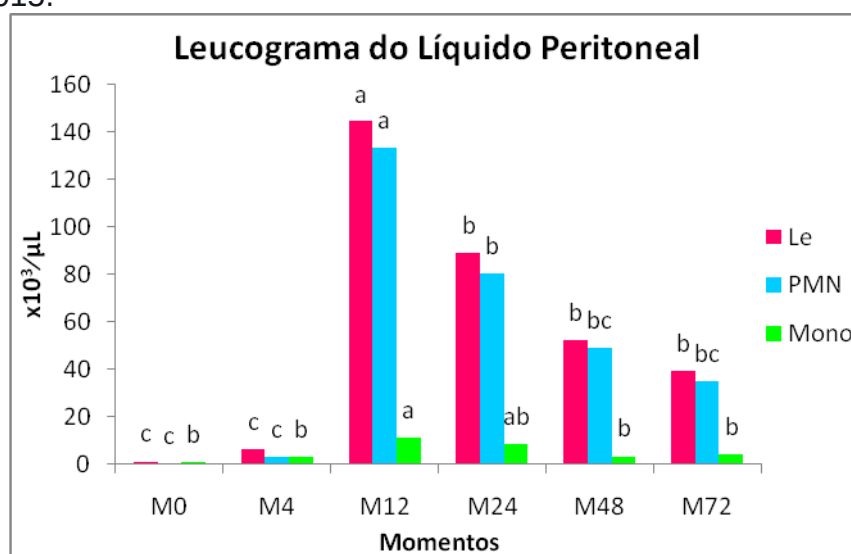
leucocitária em M12 e que tais valores se mantiveram elevados até M72, quando comparados ao momento basal. Os polimorfonucleares e mononucleares tiveram aumento ($p \leq 0,05$) em M12, quando comparados ao momento basal (Figura 12).

Tabela 4. Médias ($\pm$ EPM) das variáveis hematológicas avaliadas no líquido peritoneal de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor. Jaboticabal, 2015.

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

He – Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$); Hb – hemoglobina (g/dL); Ht – hematócrito (%); Plaq – plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$); Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ($p > 0,05$).

Figura 12. Evolução na contagem total de leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares do líquido peritoneal de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor. Jaboticabal, 2015.



Le – leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$); Poli – polimorfonucleares ($\times 10^3/\mu\text{L}$); Mono – mononucleares ($\times 10^3/\mu\text{L}$); Médias seguidas de mesma letras na linha não diferem entre si ($p > 0,05$).

4.4 Avaliação Zimográfica

4.4.1 Plasma

Neste ensaio, a avaliação zimográfica como método de detecção das MMPs foi satisfatória, uma vez que permitiu visibilização bem definida das bandas.

Por intermédio da análise zimográfica do plasma, foram detectadas em todos os animais empregados neste estudo, apenas atividades gelatinolíticas relacionadas às formas latentes das MMPs (PróMMP-2 e PróMMP-9). Estas foram diferenciadas através de seus respectivos pesos moleculares, as quais se apresentaram fortemente marcadas nas amostras e em todos os momentos experimentais, conforme Figura 13. Deve-se destacar a ausência de bandas gelatinolíticas referente às enzimas MMP-2 e MMP-9, em sua forma ativa, em todas as amostras estudadas.

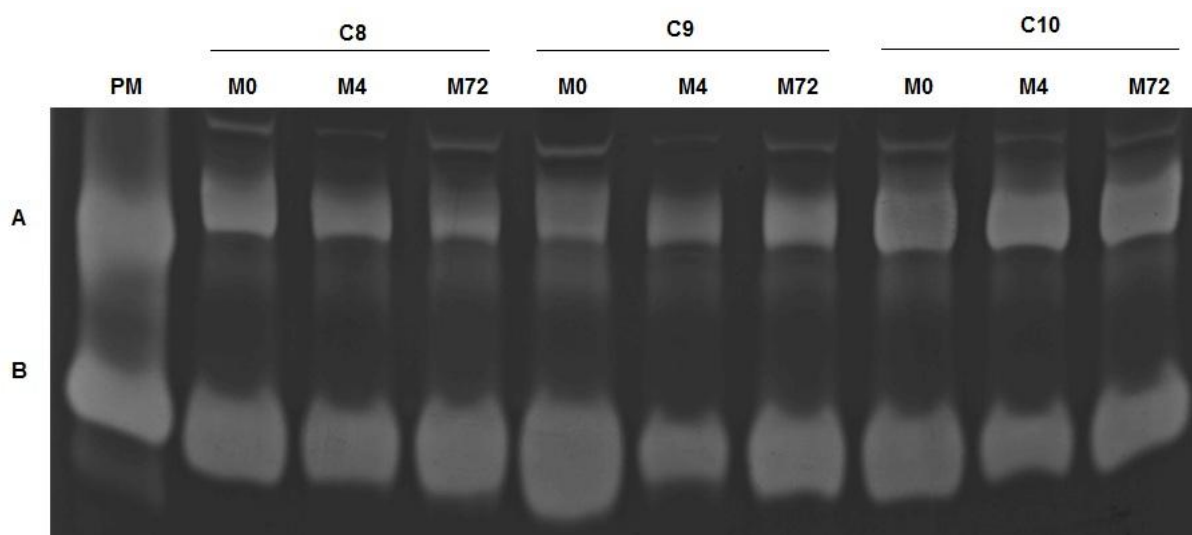


Figura 13. Imagem do zimograma demonstrando bandas de MMPs inativas, no plasma dos equinos submetidos à obstrução intestinal do cólon menor. Padrão de peso molecular (PM). Amostras representativas dos equinos (C8, C9 e C10) em cada momento experimental (M0, M4 e M72). Atividade gelatinolítica equivalente à PróMMP-9 (92kDa) representada por (A) e a PróMMP-2 (72kDa) representada por (B). Araçatuba, 2014.

Conforme visibilizado na Figura 14 observa-se diminuição ($p \leq 0,05$) da expressão da PróMMP-2 em M4. Já em relação à expressão da PróMMP-9, não foram observadas alterações significativas na atividade da enzima, nos diferentes momentos avaliados.

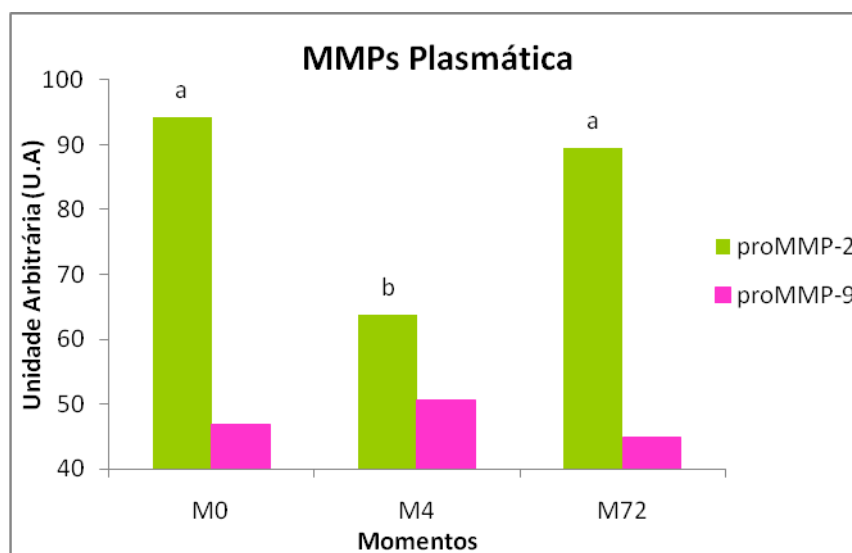


Figura 14. Atividade gelatinolítica de PróMMP-2 e PróMMP-9 no plasma de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor. Valores expressos em unidades arbitrárias (U.A), ao longo do tempo expresso em horas. Momentos com letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Conforme demonstrado na Tabela 5, observa-se as médias ($\pm$ desvios-padrão) e mediana das atividades das PróMMPs (2 e 9), no plasma, obtidas como unidade arbitrárias.

Tabela 5. Médias ($\pm$ desvios-padrão) e medianas das PróMMP-2 e PróMMP-9 plasmáticas, de equinos submetidos à obstrução intestinal do cólon menor. Jaboticabal, 2015.

Variáveis	M0	M4	M72
PróMMP-2 Plasmática	94,25 $\pm$ 17,37 ^a (91,88)	63,71 $\pm$ 12,93 ^b (62,26)	89,51 $\pm$ 18,95 ^a (86,45)
PróMMP-9 Plasmática	46,75 $\pm$ 19,16 (42,32)	50,65 $\pm$ 18,22 (41,31)	44,92 $\pm$ 13,40 (41,11)

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

4.4.2 Líquido Peritoneal

Através da análise zimográfica foram detectadas em todas as amostras de líquido peritoneal de equinos empregados neste estudo, somente atividades gelatinolíticas relacionadas às formas latentes das MMPs (PróMMP-2 e PróMMP-9), as quais foram diferentemente marcadas nos momentos experimentais, conforme Figura 15. Deve-se destacar a ausência de bandas gelatinolíticas referente às enzimas MMP-2 e MMP-9, em sua forma ativa, em todas as amostras estudadas.

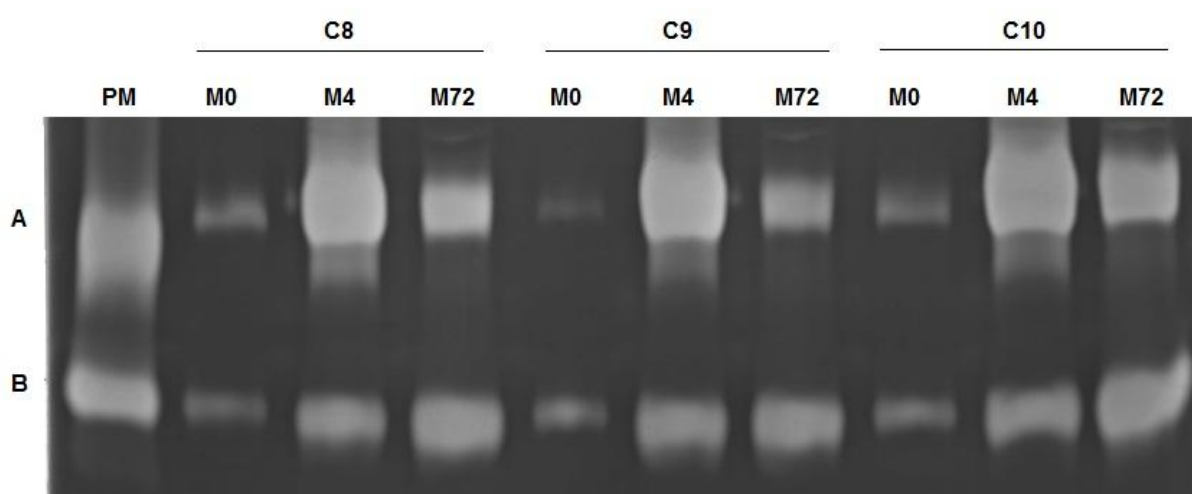


Figura 15. Imagem do zimograma demonstrando bandas de MMPs inativas, no líquido peritoneal dos equinos submetidos à obstrução intestinal do colón menor. Padrão de peso molecular (PM). Amostras representativas dos equinos (C8, C9 e C10) em cada momento experimental (M0, M4 e M72). Atividade gelatinolítica equivalente à PróMMP-9 (92kDa) representada por (A) e à PróMMP-2 (72kDa) representada por (B). Araçatuba, 2014.

Conforme Figura 16 observa-se que a expressão de PróMMP-2 teve elevação ($p \leq 0,05$) em M72. Em relação à expressão da PróMMP-9 houve aumento ($p \leq 0,05$) em M4.

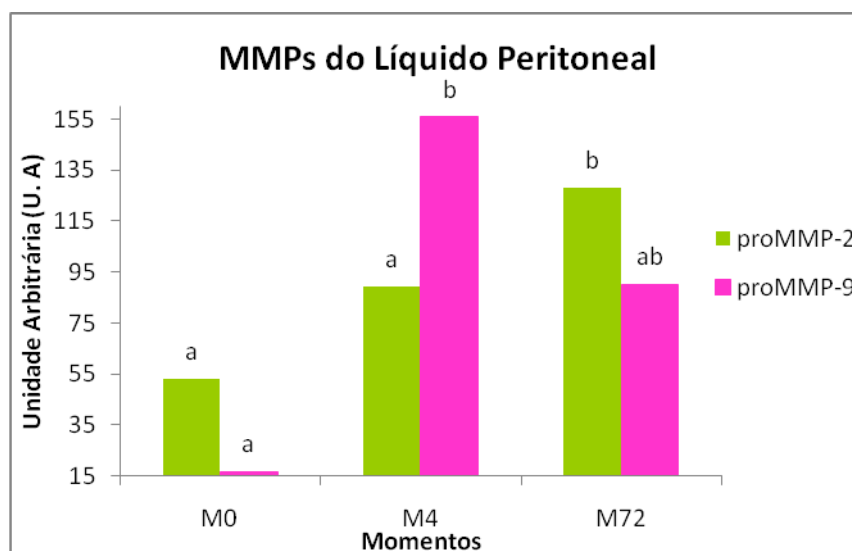


Figura 16. Atividade gelatinolítica de PróMMP-2 e PróMMP-9 no líquido peritoneal de equinos submetidos experimentalmente à obstrução simples do cólon menor. Valores expressos em unidades arbitrárias (U.A). Momentos com letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Conforme demonstrado na Tabela 6, observa-se as médias ($\pm$ desvios-padrão) e mediana das atividades das PróMMPs (2 e 9), no líquido peritoneal, obtidas como unidade arbitrárias.

Tabela 6. Valores médios, desvios-padrão e mediana das PróMMP-2 e PróMMP-9 do líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução intraluminal de cólon menor. Jaboticabal, 2015.

Variáveis	M0	M4	M72
PróMMP-2	53,06 $\pm$ 30,81 ^a	89,41 $\pm$ 17,63 ^a	128,13 $\pm$ 28,74 ^b
Líquido Peritoneal	(50,48)	(88,18)	(123,00)
PróMMP-9	16,69 $\pm$ 14,41 ^a	155,77 $\pm$ 16,30 ^b	90,20 $\pm$ 34,76 ^{ab}
Líquido Peritoneal	(10,55)	(161,49)	(85,86)

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

5. DISCUSSÃO

O modelo utilizado para reproduzir experimentalmente a obstrução simples do cólon menor, por meio da introdução intraluminal de um balão de látex, sob a pressão de 80mmHg, durante quatro horas mostrou-se eficiente, tendo a compressão da parede intestinal provocado isquemia parcial. A perfusão tecidual foi prejudicada no período de manutenção do balão e as observações realizadas no período pós-cirúrgico de 72 horas evidenciaram ocorrência de alterações funcionais, em especial, ativação da resposta inflamatória local, assim como, sistêmica. No entanto, observou-se que a resposta inflamatória foi moderada e que houve ao final de 72 horas, regressão das respostas.

Na presente pesquisa as elevações da frequência cardíaca e temperatura retal, observadas às 12 horas, e da frequência respiratória, registrada às 24 horas, também foram observadas por outros autores após a realização de laparotomia em equinos, tanto sob condições experimentais quanto em cirurgias abdominais realizadas em caso de abdômen agudo de ocorrência natural.

Nossos achados assemelham-se ao de Teixeira (2011) a qual observou aumento na aferição cardíaca após 12 horas à obstrução intestinal do cólon menor com o uso de dreno de Penrose. A referida autora acredita que esse achado tenha sido mediado pelo estímulo ao sistema nervoso simpático, como resposta à dor ocasionada pela distensão intestinal. Ainda que não significativo, a FR apresentou-se ligeiramente elevada para o padrão da normalidade a partir de 24 horas após o procedimento cirúrgico.

Em concordância ao que foi observado neste ensaio, Uribe, Valadão e Santana (2008) notaram elevação da frequência cardíaca com 7,5 e 9 horas ao fim da desobstrução experimental do jejuno. Enquanto que a resposta febril ocorreu a partir de 6 e 7,5 horas após cirurgia. Tais ocorrências são justificadas pelos autores em resposta à indução de endotoxinas e mediante a liberação de mediadores inflamatórios provenientes do comprometimento vascular causado pelo dreno de Penrose. Já a FR não apresentou alterações significativas entre os grupos estudados e durante os períodos experimentais.

Nosso ensaio concorda com os registros de Costa (2008a) de equinos submetidos à obstrução experimental de jejuno, que mesmo não significativa a FC

mantinha-se elevada após 18 horas de reperfusão, quando comparado ao basal. Já o aumento significativo da FR ocorreu após 1 hora de reperfusão diferindo do que foi constatado em nosso ensaio. De acordo com Costa (2008a), são atribuídos tais achados ao comprometimento e dor abdominal, assim como sua interferência sobre o sistema cardiovascular.

Embora não tenhamos incluídos, em nossos estudos, as respostas referentes às variáveis clínicas durante o período de obstrução do cólon menor, os resultados de Di Filippo et al. (2011) apontam elevação da FC e FR durante as três horas de processo isquêmico, como resposta à dor em virtude da distensão intraluminal. Além de descrever ausência de alterações na T_R de equinos induzidos experimentalmente a obstrução de duodeno e íleo, por meio de dreno de Penrose. Provavelmente, este efeito imediato observado por Di Filippo et al. (2011) ocorreu em virtude de processo inflamatório grave, uma vez que o uso do dreno de Penrose promoveu lesão estrangulante, enquanto optou-se em nosso estudo por uma metodologia que não causasse oclusão vascular estrangulante.

Entretanto, no que concerne a laparotomia para correção de distúrbios intestinais de causas naturais verificou-se em estudo dirigido por Fagliari et al. (2008), que a FC, FR e T_R aumentaram significativamente 24 horas após correção cirúrgica. Situação equivalente à nossa pesquisa, a qual também foi observada que no mesmo período citados os valores de FC e FR permaneciam elevados.

Em estudo realizado por Di Filippo, Santana e Coleta (2009) houve elevação significativa da frequência cardiorespiratória desde o período basal até o décimo dia após a realização da celiotomia de equinos sobreviventes ou não, sendo que tais autores referem a ocorrência de taquicardia e taquipnéia devido à dor. No que diz respeito à temperatura retal não foram observadas diferenças significativas em todos os momentos de avaliação.

Neste ensaio, justifica-se o aumento da frequência cardiorespiratória considerando-se que a distensão intestinal promovida pelo balão de látex certamente promoveu situação de dor e estresse. Tais fatores induzem a liberação sistêmica de epinefrina pela medula adrenal, que por sua vez bloqueia a ação do sistema nervoso parassimpático e, conseqüentemente aumenta a ação da atividade

do sistema nervoso simpático, resultando em elevação da frequência cardíaca e respiratória (McKEEVER; HINCHCLIFF, 1995).

Em que pese Freeman et al. (2012), afirmarem que elevações da temperatura retal associadas a infecção somente ocorram após 2,7 dias, neste caso a elevação da T_R pode, sob nossa óptica, ser atribuída ao desenvolvimento de resposta inflamatória. Os valores de TPC e motilidade intestinal não apresentaram alterações significativas.

O decréscimo observado no número de hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e plaquetas (Plaq), quatro horas após a obstrução intestinal (M4) pode ser atribuído a ação de drogas anestésicas por sequestro de hemácias para o baço e, em virtude da perda de sangue assim como fluidos corporais, decorrente de lesão dos vasos sanguíneos por trauma, durante o procedimento cirúrgico (JAIN, 1993; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Situação semelhante foi observada em estudo experimental em equinos submetidos a enterotomia no cólon descendente executado por Valente (2001), a qual registrou decréscimo nos valores totais de hemácias, hemoglobina e hematócrito nas primeiras 6 horas pós cirurgia, atribuindo tal ocorrência à perda de sangue devido ao trauma cirúrgico. Faleiros (2003) verificou redução no número de hemácias e hemoglobina logo aos 30 minutos após intervenção cirúrgica, fato este que foi atribuído à cirurgia.

Os resultados dos índices eritrocitários de Teixeira (2011) confirmou diminuição na contagem do número de hemácias e no teor de hemoglobina, a partir de 2 até 6 horas da fase experimental. A referida autora detectou diminuição de hemoglobina e volume globular após 10 dias de instrumentação. Concomitantemente verificou-se o aumento de fibrinogênio e diminuição de hemácias, conferindo estas alterações hematológicas à presença de processo inflamatório crônico, associado à injúria tecidual ou infecção.

Di Filippo, Santana e Coleta (2009) descreveram em equinos acometidos com cólica de causa natural e submetidos à laparotomia exploratória, elevação no número de hemácias antes do procedimento cirúrgico sugerindo hemoconcentração devido à desidratação. Contudo, durante as fases de 24 e 48 horas após cirurgia

registraram diminuição na contagem de hemácias, possivelmente à perda sanguínea durante o procedimento cirúrgico e ao restabelecimento da volemia.

A contagem total de leucócitos e bastonetes apresentou elevações ($p \leq 0,05$) registradas em M12 e M24. Em referência aos neutrófilos segmentados foram constatados aumentos ($p \leq 0,05$) em M12 e M36. Neste estudo, observou-se leucocitose por neutrofilia, com desvio a esquerda regenerativo após intervenção cirúrgica, o qual de acordo com Lassen e Swardson (1995) sugerem como indicador mais específico e sensível para a presença de processo inflamatório a existência do desvio a esquerda, sendo que a amplitude do desvio indica o grau de demanda tecidual por neutrófilos.

Tais observações descritas neste ensaio estão em conformidade com Stockham e Scott (2011) e Weiser (2015), ao afirmarem que durante o estabelecimento da inflamação verifica-se vasodilatação e presença de substâncias quimiotáticas, fatores estes que auxiliam no deslocamento de neutrófilos do compartimento marginal local para o interior da lesão inflamatória.

Ainda, corroborando as afirmações encontradas neste trabalho, Jain (1993) e Weiser (2015) afirmam que quando o organismo é exposto a estímulos excitatórios, tais como estresse, ansiedade e dor há liberação de epinefrina, a qual resulta em aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente promove o deslocamento de leucócitos do compartimento marginal para o compartimento circulatório.

Em estudos experimentais, quadro similar ao nosso estudo foi descrito por Valente (2001), que relatou leucocitose e neutrofilia, nas primeiras 6 horas após ato cirúrgico, em resposta ao estresse fisiológico. Di Filippo et al. (2011), verificaram leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda, durante a fase de 24 e 72 horas de reperfusão assegurando a presença de processo inflamatório conseguinte à obstrução intestinal.

A semelhança dos nossos achados Teixeira (2011), descreve leucocitose com início entre 8 a 12 horas e neutrofilia entre 12 e 24 horas ambos no período de reperfusão intestinal, referindo desenvolvimento de processo inflamatório agudo. O mesmo foi relatado por Alonso (2013), ao descrever aumento na contagem de leucócitos e neutrófilos 12 horas após o procedimento cirúrgico em virtude da resposta fisiológica ao estresse ou doença secundária. Porém, Costa et al. (2008b)

aludem ausência de alterações significativas nos valores de leucócitos totais e neutrófilos bastonetes, sendo descrito aumento no número de neutrófilos segmentados ao final de 4 horas de obstrução intestinal até 18 horas de reperfusão.

No trabalho desenvolvido por Montello et al. (2004), os quais procederam laparotomia em estação e enterotomia em cólon menor de equinos, estes descreveram elevação no número de leucócitos concomitante desvio à esquerda nas fases experimentais de 24 e 48 horas após o ato cirúrgico, sendo o retorno aos valores normais com 72 horas do fim da cirurgia.

No entanto, estudos em equinos portadores de abdômen agudo de ocorrência natural submetidos à laparotomia, mencionam a presença de leucocitose desde a fase pré-cirúrgica estendendo-se até 72 horas após correção cirúrgica (FAGLIARI et al., 2008). Todavia Nogueira (2014), afirma a presença de leucocitose por neutrofilia com desvio a esquerda, em equinos acometidos com cólica de ocorrência natural, apenas na fase final da avaliação leucocitária correspondendo ao período de 96 horas até 168 horas após cirurgia.

Ainda que, neste trabalho, não se tenha mensurado a concentração de cortisol verificou-se que a inflamação causada pela lesão, dor associada ao trauma ou período pós-cirúrgico desencadearam situações de estresse. E com isso os organismos dos equinos empregados neste estudo certamente responderam a tais fatores com a liberação de cortisol, o qual é considerado responsável pela diminuição da viscosidade e marginalização celular neutrofílica, que por sua vez se acumula na circulação (MORRIS, 2009; WEISER, 2015).

De acordo com Voight e Swist (2011), os neutrófilos estão presentes na circulação sanguínea durante o período, em média, de 6 a 7 horas antes de migrarem para o interior dos tecidos e cavidade corporal. Inclusive, são tidos como as células de defesa predominantes do sangue periférico de equinos. A principal atividade dos neutrófilos está associada à inflamação e fagocitose, pois o tecido danificado libera toxinas e substâncias químicas que atraem os neutrófilos para a área lesada. Dentre as causas mais comuns de neutrofilia pode-se destacar a inflamação, especialmente quando há necrose tecidual, e a presença de corticosteróide ou epinefrina devido excitação ou estresse.

Em relação aos eosinófilos, houve diminuição ($p \leq 0,05$) entre os períodos M12 e M36. A eosinopenia pode ser incriminada secundariamente ao aumento endógeno ou exógeno de corticosteróide (JAIN, 1993; MORRIS, 2009; VOIGHT; SWIST, 2011; WELLES, 2010; STOCKHAM; SCOTT, 2011) e em processos inflamatórios ativos, pois se acredita que os eosinófilos regulam a hipersensibilidade imediata e as respostas inflamatórias pela inativação de histamina, leucotrienos, fator ativação plaquetária e outros mediadores químicos envolvidos nestes processos (JAIN, 1993; MORRIS, 2009).

Assim como em nosso estudo foi observado por Costa et al. (2008b) diminuição no número de eosinófilos após 18 horas de desobstrução de jejuno. Teixeira (2011) evidenciou eosinopenia nas primeiras 24 horas após desobstrução do cólon descendente. De acordo com o ensaio de Di Filippo, Santana e Coleta (2009), os mesmos referem eosinopenia, nas primeiras horas subsequentes à laparotomia, de equinos sobreviventes ou não. Ainda, Di Filippo et al. (2011) descrevem acentuada diminuição no número de eosinófilos, em equinos submetidos à obstrução experimental de duodeno e jejuno, na fase inicial de reperfusão. Em compensação Fagliari et al. (2008) e Alonso (2013), relatam ausência de alterações significativas nos valores de eosinófilos após intervenção cirúrgica.

Por sua vez, no presente experimento os valores referentes aos linfócitos registraram diminuição ($p \leq 0,05$) entre M4 e M36 e em M60. Weiser (2015) e Morris (2009), afirmam que entre as causas mais comuns de linfopenia em equinos está a resposta ao estresse e à presença endógena ou exógena de corticosteróides. Em concordância Welles (2010), estabelece que linfopenia é o componente do leucograma associado ao estresse, além de ser observado em desordens inflamatórias aguda.

A ocorrência de diminuição de linfócitos foi observada em inúmeros outros estudos na fase pós-cirúrgica de laparotomia experimental e de ocorrência natural. Nossos resultados se encontram em equivalência com Faleiros (2003), que observou linfopenia a partir de 150 minutos após a distensão e com Valente (2001), a qual relata redução no número de linfócitos nas primeiras 6 horas do término cirúrgico demonstrando resposta inicial do leucograma ao estresse e à inflamação. Costa et al. (2008b), observou linfopenia ao final de 4 horas de obstrução intestinal

do jejuno, a qual fez alusão ao resultado obtido como característica de afecções inflamatórias.

Igualmente verificado em nosso trabalho Di Filippo et al. (2011), relatam em equinos obstruídos experimentalmente no jejuno e íleo diminuição do número de linfócitos, no período de 24 e 72 horas de reperfusão intestinal. Nogueira (2014) descreve em animais obstruídos experimentalmente em duodeno, íleo e flexura pélvica, queda no número de linfócitos, imediatamente após o procedimento cirúrgico.

Em equinos acometidos com transtornos abdominais de procedências naturais e submetidos à correção cirúrgica, notaram-se linfopenia nas primeiras 24 e 48 horas após laparotomia (DI FILIPPO; SANTANA; COLETA, 2009). Neste estudo, os valores referentes aos basófilos e monócitos não se alteraram ($p>0,05$) após o procedimento cirúrgico.

Neste estudo, todas as abdominocenteses foram coletadas com sucesso e não ocorreu nenhum acidente, confirmando a praticidade, eficiência e segurança da técnica à semelhança do relatado por Tulleners (1983). Tal como observado por Di Filippo (2011a), os resultados obtidos neste ensaio demonstram que a colheita com cânula mamária é segura, prática e eficiente, sendo efetuada única incisão abdominal em M0 e, posteriormente realizavam-se as colheitas subsequentes, mantendo os cuidados necessários a qualquer procedimento invasivo, dentre eles antisepsia local, utilização de luvas e cânulas estéreis.

Em contrapartida, Lopes et al. (1999), ao avaliarem as alterações no fluido peritoneal de equinos, em virtude da obstrução e abrasão do íleo associada à indução de endotoxemia, relataram insucessos na colheita ao utilizarem agulha hipodérmica 40x12 estéril e ocorrência de enterocentese. Louro, Dias e Soto-Blanco (2006) relataram que algumas colheitas de fluido peritoneal de asininos saudáveis utilizando-se agulha hipodérmica estéril foram improdutivas e alguns animais sofreram enterocentese.

Nosso ensaio possibilitou observar que as hemácias, hemoglobina e hematócrito aumentaram ($p\leq 0,05$) no período M4 e M12 em relação aos valores

basais. Nos casos em que há alterações circulatórias nas cólicas por obstrução simples, a progressão da lesão vascular levará ao extravasamento de hemácias para a cavidade abdominal (MENDES et al., 2000).

Tal fato é congruente ao observado por Valente (2001), que verificou contaminação do fluido peritoneal por sangue entre 6 e 18 horas pós cirurgia. Faleiros (2003), também constatou contaminação por sangue durante os 180 minutos de obstrução intestinal. Já Di Filippo (2011), observou contaminação por sangue desde os 60 minutos de isquemia até 24 horas de reperfusão imediata. A avaliação do fluido peritoneal conduzida por Louro; Dias e Soto-Blanco (2006), demonstrou contaminação sanguínea do terceiro ao nono dia de coleta.

Assim como observado por Gravena (2014), deve-se considerar que, em M4 ocorreu derrame sanguíneo na cavidade abdominal, em decorrência do ato cirúrgico, promovendo assim diminuição no número de hemácias, hemoglobina e hematócrito no leito vascular e, conseqüentemente desencadeou a elevação destas variáveis no líquido peritoneal no mesmo período citado. Uma vez que células eritrocitárias são raramente encontradas no fluido peritoneal de equinos saudáveis (WHITE, 1990; BROWNIG, 2005).

White (1990) e Murray (1998) asseguram que no líquido peritoneal de equinos sadios a distribuição de células polimorfonucleares e mononucleares é variável, sendo os PMN predominantes com uma fração de 2:1 e que esta proporção pode variar dentro de 1 a 2 horas considerando o grau de isquemia e a extensão de alça intestinal envolvida. Esta tendência também foi observada em nossos resultados onde a proporção de PMN foi bem superior aos mononucleares.

A maioria das referências reporta que a contagem leucocitária total, no fluido peritoneal de equinos saudáveis, seja inferior a 5.000 céls/ μ L (WHITE, 1990; MURRAY, 1998; PHILLIPS; DIXON, 2002; MENDES; PEIRÓ, 2008; DABAREINER, 2009). No entanto, em casos de peritonite aguda os valores leucocitários totais podem ser superiores a 100.000 céls/ μ L, tal como após celiotomia a contagem de leucócitos alcança valores entre 100.00 a 150.000 céls/ μ L e, inclusive níveis acima de 400.000 céls/ μ L após exploração e manipulação abdominal prolongada (WHITE, 1990).

Em que pese sobre a porção leucocitária, verificou-se elevação não estatística em M4, dos leucócitos, PMN e mononucleares. Os polimorfonucleares tiveram aumento ($p \leq 0,05$) em M12 e M24, no entanto tais valores se mantiveram elevados, ainda que não estatístico, até M72. Os mononucleares aumentaram ($p \leq 0,05$) apenas em M12.

Posto isto, verifica-se neste estudo a presença de leucocitose por neutrofilia, no líquido peritoneal. Esta tendência é semelhante ao referido por Faleiros (2003), que destaca aumento na contagem leucocitária total a partir de 150 minutos de distensão intestinal, principalmente de neutrófilos bastonetes, caracterizando início de resposta do leucograma ao estresse e à inflamação. Costa (2008b) evidencia aumento de neutrófilos segmentados ao término de 4 horas de obstrução até as 18 horas de reperfusão, além de diminuição de monócitos no mesmo período citado anteriormente.

Di Filippo (2011) averiguou no duodeno e íleo de equinos obstruídos experimentalmente elevação ($p \leq 0,05$) no número de leucócitos após três horas de obstrução intestinal e durante os cinco primeiros dias do período de reperfusão, justificando tal aumento devido à instalação do processo inflamatório proveniente da lesão entérica. Acredita-se que os resultados demonstrados por Lopes et al. (1999), destacam elevação da contagem dos leucócitos a partir de 24 horas até o 13º dia após laparotomia, onde o pico foi observado no logo nas primeiras 24 horas ao término da cirurgia.

Os dados do presente experimento enfatizam o postulado referente à migração de células PMN e mononucleares, através de capilares ou vênulas para o local da injúria, como resposta aos processos inflamatórios, por exemplo, de natureza isquêmica. Desta forma, corrobora com Weiss e Wardrop (2010) ao afirmarem que os neutrófilos amplificam a resposta inflamatória atraindo ainda mais células inflamatórias para o foco da lesão.

A avaliação dos leucócitos, no líquido peritoneal, auxilia na detecção e monitoramento dos processos inflamatórios, uma vez que os primeiros sinais de anormalidade são os aumentos da taxa de proteína e da contagem total de leucócitos, sobretudo de PMN que indica inflamação aguda (PHILLIPS; DIXON, 2002; MENDES; PEIRÓ, 2008).

A análise sérica e peritoneal das enzimas proteolíticas realizadas neste trabalho em equinos submetidos experimentalmente a lesões inflamatórias intestinais é inédita, sendo observadas algumas alterações significativas. Entretanto a escassez de publicações científicas em medicina equina acerca deste tema limita a discussão mais minuciosa.

Somente o trabalho descrito por Arosalo et al. (2007) constatou, em equinos acometidos com cólica, que a atividade de próMMP-9 e MMP-9 ativa aumentou na urina, enquanto MMP-2 aumentou no plasma desses mesmos animais, quando comparados aos equinos controle. Deve-se ressaltar que, no trabalho de Arosalo et al. (2007) os tipos e tempo de evolução dos distúrbios gastrointestinais dos animais foram mais graves e prolongados em comparação aos animais verificados neste estudo, o que possivelmente justificaria a detecção da expressão de metaloproteinases em sua forma ativa.

Em alternativa, estudos na medicina humana realizados em outros modelos de inflamação relatam a expressão da próMMP-2 e próMMP-9 em 80% e 75% das amostras teciduais de pacientes adultos e pediátricos com doenças intestinais inflamatórias, enquanto que a forma ativa de MMP-2 e MMP-9 estiveram presentes em 35% e 75% das áreas inflamadas (BAUGH et al., 1999). Pirilä et al. (2003) indicam ativa expressão de MMP-2 nas células epiteliais de camundongos que foram submetidos à indução de doença inflamatória intestinal. Garg et al. (2006) observaram elevada expressão de próMMP-2 e de sua forma ativa, em camundongos que foram submetidos a indução de colite. Lakatos et al. (2012) verificaram concentrações séricas de MMP-2 e 9 significativamente superiores em pacientes humanos com doenças intestinais inflamatórias quando comparados com pacientes saudáveis.

Oliveira et al. (2014) obtiveram em fragmentos de cólon de camundongos induzidos com colite, intensa expressão de MMP-2 e o início da atividade de MMP-9, quando comparados aos animais saudáveis. Diferentemente do resultado obtido neste experimento, Siloși et al. (2014) ao analisarem amostras sanguíneas de pacientes humanos com doença inflamatória intestinal descreveram níveis

significativamente superiores de MMP-9, porém o referido autor não avaliou a expressão de MMP-2.

Lakatos et al. (2012), descreveram que MMP-2 é expressa constitutivamente, sendo responsável por regular a função de defesa e barreira da mucosa do cólon. Esses mesmos autores afirmam que MMP-9 é a protease mais abundante em processos inflamatórios intestinais e sugerem que tal enzima possa ser considerada como um marcador adicional de danos à mucosa, a qual se correlaciona com a severidade da inflamação. A degradação dos componentes da matriz extracelular celular com subsequente perda da integridade da mucosa, durante processo inflamatório ocorre mediante a liberação de MMP-9 pelas células epiteliais intestinais (MEDINA; RADOMSKI, 2006).

Em estudo conduzido por Cheong et al. (2003) verificou-se elevada concentração de MMP-9 no fluido peritoneal de mulheres com aderência pélvica após 48 horas de cirurgia. Já Hung et al. (2004) constataram concentrações elevadas de MMP-2 no fluido peritoneal de mulheres com endometriose associada à infertilidade.

Acredita-se que, no presente estudo, os resultados encontrados acerca da atividade de próMMP-2 e próMMP-9 em M4 estão associados ao redirecionamento destas enzimas do plasma para a cavidade abdominal, em virtude do procedimento cirúrgico, uma vez que no mesmo momento avaliado obteve-se aumento da atividade proteolítica no líquido peritoneal.

Diante do exposto considera-se que os momentos escolhidos para a análise zimográfica não foram adequados para detectar a presença das enzimas em suas formas ativas, em virtude da estreita relação entre as MMPs, resposta inflamatória e processo de cicatrização. Em M0 e M4 não se registrou resposta leucocitária alterada, pois este ocorreu de fato às 12 horas após o término da cirurgia, possivelmente devido o processo de reperfusão decorrente da isquemia parcial, promovida pelo balão intraluminal o qual comprimiu a parede intestinal com pressão de 80mmHg, sendo suficiente para impedir a perfusão dos tecidos intestinais.

O aumento significativo de PróMMP-9 no líquido peritoneal ao final da cirurgia (M4) é forte indício de ativação da expressão de MMP-9, porém dado o longo intervalo até 72 horas quando esta foi investigada, seus valores já haviam retornado próximo ao basal.

De acordo com Koller et al. (2002) e Koelink et al. (2014), as doenças inflamatórias intestinais tem sido associadas a presença de macrófagos infiltrantes, os quais constituem as principais fontes de MMP-9, além de outros tipos como MMP-8 e MMP-10 no homem e rato. O aumento expressivo de macrófagos no líquido peritoneal foi observado neste trabalho em M12, embora neste momento as enzimas proteolíticas não foram avaliadas.

Os neutrófilos são os principais contribuintes para aumentos de MMP-9 na inflamação intestinal, onde esta é armazenada em grânulos e pode ser liberada após estimulação (VANDOOREN; VAN DEN STEEN; OPDENAKKER, 2013; KOELINK et al., 2014). O aumento de PróMMP-9 observado em M4 foi acompanhado de elevação de PMN, embora esta não tenha sido significativa neste momento. O aumento significativo de PMN ocorreu de fato em M12, o qual foi estimulado possivelmente pela reperfusão tecidual e se manteve elevado até M72, quando a PróMMP-9 ainda estava alta mesmo sem diferir do basal. Mais uma vez, os momentos de análises não permitiram a detecção do aumento de MMP-9, mas certamente é possível inferir que este aumento tenha ocorrido no intervalo entre M4 e M72.

Relativamente, a diminuição plasmática de PróMMP-2 em equinos no final da laparotomia (M4) infere-se que esta possa estar associada a modulação da resposta inflamatória como já foi observado para a MMP-2 no intestino de humanos (O'SULLIVAN; GILMER; MEDINA, 2015).

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram inferir que o trauma cirúrgico causado pela indução experimental de obstrução do cólon menor promoveu alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta inflamatória sistêmica moderada e transitória.

Nas condições deste ensaio a análise zimográfica no plasma e líquido peritoneal permitiu visibilizar a expressão das MMPs, contudo foram detectadas somente as atividades gelatinolíticas referente as formas latentes das MMPs.

Diante do exposto se faz necessário a realização de novos estudos avaliando com maiores detalhes a influência da intensidade e evolução das lesões morfológicas da resposta inflamatória sobre a liberação e ativação das MMP-2 e MMP-9.

7. REFERÊNCIAS

ABUTARBUSH, S.M.; CARMALT, J.L.; SHOEMAKER, R.W. Causes of gastrointestinal colic in horses in western Canada: 604 cases (1992 to 2002). **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p. 800-805, 2005.

ACKERMANN, M. R. Inflamação e cicatrização. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Bases da patologia em veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. cap. 3, p. 89-135.

ALLAN, J. A.; DOCHERTY, A. J.; BARKER, P. J.; HUSKISSON, N.S.; REYNOLDS, J.J.; MURPHY, G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. **Biochemical Journal**, v. 309, p. 299–306, 1995.

ALONSO, J. M. **Avaliação da reatividade peritoneal de equinos submetidos à enterotomia de cólon menor e tratados com heparina pela via subcutânea**. 2013. 173f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

ARAÚJO, R. V. D. S.; SILVA, F. O.; MELO-JÚNIOR, M. R.; PORTO, A. L. F. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82–88, 2011.

ARESU, L.; BENALI, S.; GIANNUZZI, D.; MANTOVANI, R.; CASTAGNARO, M.; FALOMO, M. E. The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, p. 171–177, 2012.

AROSALO, B. M.; RAEKALLIO, M.; RAJAMÄKI, M.; HOLOPAINEN, E.; KASTEVAARA, T.; SALONEN, H.; SANKARI, S. Detecting early kidney damage in horses with colic by measuring matrix metalloproteinase -9 and -2, other enzymes, urinary glucose and total proteins. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, n. 4, 2007.

ASAWAKARN, S.; ASAWAKARN, T. Role of matrix metalloproteinases in animals. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, n. 2, p. 137-142, 2012.

BARRETT, A. J.; SAKLATVALA, J. Proteinases in joint disease. In: **Textbook of Rheumatology**. Eds: W.N. Kelley, E.D. Harris, S. Ruddy and C.B. Sledge. W.B. Saunders. Philadelphia. p. 182-196, 1985.

BASS, J. A.; FRIESEN, C. A.; DEACY, A. D.; NEILAN, N. A.; BRACKEN, J. M.; SHAKHNOVICH, V.; SINGH, V. Investigation of potential early histologic markers of pediatric inflammatory bowel disease. **Bio Med Central Gastroenterology**. v. 15, n. 129, p.1-7, 2015.

BAUGH, M. D.; PERRY, M. J.; HOLLANDER, A. P.; DAVIES, D. R.; CROSS, S. S.; LOBO, A. J.; TAYLOR, C. J.; EVANS, G. S. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 117, p. 814-822, 1999.

BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 1, p. 29–36, 2012.

BERMEJO, V.; ZEFFERINO, C.; JUNIOR, J. M. F.; SILVÉRIO, M. R. Abdômen agudo equino (síndrome cólica). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VI, n. 10, 2008.

BIRKEDAL-HANSEN H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **Journal Periodontology**. v. 64, p. 474-484, 1993.

BLIKSLAGER, A.T.; MOESER, A.J.; GOOKIN, J.L. et al. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. **Physiological Review**. v. 87, p. 545-564, 2007.

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

BOENING, K. J.; LEENDERTSE, I. P.; Review of 115 cases of colic in the pregnant mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 6, p. 518-521, 1993.

BROWNIG, A. Diagnosis and management of peritonitis in horses. **In practice**, v.27, p. 70-75, 2005.

CANELLO, V. A. **Expressão das metaloproteinases e morfologia do tecido laminar do casco de equinos submetidos à obstrução intra-luminal do cólon menor.** 2013. 53f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

CERQUEIRA, N. F., HUSSNI, C. A., YOSHIDA, W. B. “Pathophysiology of mesenteric ischemia- reperfusion: a review”. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 336-343, 2005.

CHEONG, Y. C.; SHELTON, J. B.; LAIRD, S. M.; LI, T. C.; LEDGER, W. L.; COOKE, I. D. Peritoneal fluid concentrations of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and transforming growth factor-beta in women with pelvic adhesions. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 5, 2003.

CLEGG, P. D; BURKET, R. M; COUGHLANS, A. R; RIGGS, C. M; CARTER, S. D. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9 and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 5, p. 335-342, 1997.

CLEGG, P. D; JONES, M. D; CARTER, S. D The effect of drugs commonly used in the treatment of equine articular disorders on the activity of equine matrix metalloproteinase-2 and 9. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy**, v. 21, p. 406-413, 1998.

CLUTTERBUCK, A. L.; HARRIS, P.; ALLAWAY, D.; MOBASHERI, A. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **Veterinary Journal**, v. 183, n.1, p. 27–38, 2010.

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 equinos: efeito da hidro cortisona nos parâmetros clínicos e laboratoriais.** 2008. 142f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008a.

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

COSTA, R. S.; PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S.; RIO TINTO, J. J. M.; ALESSI, A. C.; FALEIROS, R. R. Alterações ultraestruturais nas vilosidades do jejuno de equinos após distensão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.62, n. 5, p.1036-1042, 2010.

DABAREINER, R. M. Peritonitis in horse. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. (4. Ed.) Missouri: Mosby Elsevier, 2009. cap. 32, p. 761-765.

DI FILIPPO, P. A.; SANTANA, A. E.; COLETA, F. E. D. Avaliação clínica e eritroleucograma de equinos com cólica submetidos à laparotomia, sobreviventes e não sobreviventes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1246–1255, 2009.

DI FILIPPO, P. A.; BERLINGIERI, M. A.; SEUDO LOPES, M. D. C.; CAMPOS FILHO, E.; SANTANA, A. E.; PEREIRA, G. T. Eritroleucograma de equinos submetidos a obstrução experimental do duodeno, íleo e cólon maior. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n. 1, p. 1281–1289, 2011.

DI FILIPPO, P. A. **Obstrução intestinal experimental em equinos: parâmetros clínicos e laboratoriais**. 2011. 112f. Tese (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V; PRETO, R.; MN, S. P. R. Lesão de Isquemia-Reperusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 66, n. 4, p. 239–245, 1996.

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

FALEIROS, R.R. **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, 2003.

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 a distensão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 9, p. 383–387, 2007.

FALLER, D. V. Endothelial cell responses to hypoxic stress. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, p. 74-84, 1999.

FERREIRA, C.; PALHARES, M. S.; MELO, U. P.; GHELLER, V. A.; BRAGA, C. E. Cólicas por compactação em equinos: etiopatogenia, diagnóstico e tratamento. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 3, p. 117-126, 2009.

FIETZ, S.; EINSPANIER, R.; HOPPNER, S.; HERTSCH, B.; BONDZIO, A. Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 3, p. 266-271, 2008.

FLAHERTY, J. T., WEISFELDT, M.L. Reperfusion injury. **Free Radical Biology Medicine**, v. 5, n. 9, p. 409-419, 1988.

FOSQUEIRA, E. C.; JON, L. Y. T. C.; MORANTE, D. R. H.; PALLATI, G. L.; SANTOS, F. A. Uso de inibidores de metaloproteinasas em la terapia periodontal. **Revista Estomológica Herediana**, v. 19, n. 2, p. 111–117, 2009.

FORBES, J. M.; COUGHLAN, M. T.; COOPER, M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Journals Diabetes**. n. 57, p. 1446-1454, 2008.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, n. 25, v. 4, p. 575-584, 2010.

FREEMAN, K. D.; SOUTHWOOD, L. L.; LANE, J.; LINDBORG, S.; ACETO, H. W. Post operative infection, pyrexia and perioperative antimicrobial drug use in surgical colic patients. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n.4, p. 476–481, 2012.

FRIDMAN, R.; FUERST, T. R.; BIRD, R. E.; HOYHTYA, M.; OELKUCT, M.; KRAUS, S.; KOMAREK, D.; LIOTTA, L. A.; BERMAN, M. L.; STETLER-STEVENSON, W. G. Domain Structure of Human 72-kDa Gelatinase / Type IV Collagenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 22, p. 15398–15405, 1992.

GALLEGUILLOS, M.; CARRILLO, R.; FLORES, G. Metaloproteinasas y Osteoartritis. **Avances em Ciencias Veterinarias**, v. 28, n. 1, p. 19–24, 2013.

GARG, P.; ROJAS, M.; RAVI, A.; BOCKBRADER, K.; EPSTEIN, S.; VIJAY-KUMAR, M.; GEWIRTZ, A. T.; MERLIN, D.; SITARAMAN, S. V. Selective ablation of matrix metalloproteinase-2 exacerbates experimental colitis: contrasting role of gelatinases in the pathogenesis of colitis. **The Journal of Immunology**. v.177, p. 4103-4112, 2006.

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

GRAVENA, K. **Respostas inflamatórias sistêmica, do casco e do cólon menor submetido à distensão em equinos. 2014.** 95f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

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

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S.G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n.3, p.178-93, 2001.

HILLYER, M. H.; TAYLOR, F. G. R.; FRENCH, N. P. A cross-sectional study of colic in horses on Thoroughbred training premises in the British Isles in 1997. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 4, p. 380-385, 2001.

HUNG, H. F.; HONG, L. H.; TAN, Y.; SHENG, J. Z. Matrix metalloproteinase 2 is associated with changes in steroid hormones in the sera and peritoneal fluid of patients with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 5, p. 1235-1239, 2004.

JAIN, N. C. Essentials of Veterinary Hematology. In: _____. (1ed.). **Blood Loss or Hemorrhagic Anemias**. Philadelphia. 1993. cap.4, p. 169-173.

JONES S.L.; SNYDER J.R.; SPIER S.J. Exame dos distúrbios do intestino grosso. In: Reed S.M; Bayly W.M. **Medicina Interna Equina**. 2000. p. 563-567

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Inflamação e reparo. In: **Patologia Veterinária**. 6.ed. Cap. 5, p. 119-165, 1997.

JUNIOR, R. Q. B.; ELOY, A. M. X.; PEREIRA, E. P.; FURTADO, J. R.; SOUZA, K. C.; LIMA, A. R.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A. TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação das metaloproteinases de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados com Artrite Encefalite Caprina na Região Semiárida do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1258, 2015.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z.; Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment, **Cell Press**, v.141, p.52–67, 2010.

KIDD, J. A.; BARR, A. R. S.; TARLTON, J. F. Use of matrix metalloproteinases 2 and 9 and white blood cell counts in monitoring the treatment and predicting the survival of horses with septic arthritis. **The Veterinary Record**, v. 161, p. 329-334, 2007.

KOELINK, P. J.; OVERBEEK, S. A.; BRABER, S.; MORGAN, M. E.; HENRICKS, P. A.; RODA, M. A.; VERSPAGET, H. W.; WOLFKAMP, S. C.; VELDE, A. A.; JONES, C. W.; JACKSON, P. L.; BLALOCK, J. E.; SPARIDANS, R. W.; KRUIJTZER, J. A. W.; GARSSSEN, J.; FOLKERTS, G. KRANEVELD, A. D. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. **Gut**. v. 63, p. 578-587, 2014.

KOLLER, F. L.; DOZIER, E. A.; NAM, K. T.; SWEE, M.; BIRKLAND, T. P.; PARKS, W. C.; FINGLETON, B. Lack of MMP10 exacerbates experimental colitis and promotes development of inflammation-associated colonic dysplasia. **Laboratory Investigation**. v. 92, n. 12, p. 1749-1759, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. Inflamação aguda e crônica. In: _____. 8 ed. **Patologia Bases Patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 43-77.

KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and toxicological methods**, v. 61, n. 2, p. 205-209, 2010.

LAKATOS, G.; HRITZ, I.; VARGA, M. Z.; JUHÁSZ, M.; MIHELLER, P.; CIERNY, G.; TULASSAY, Z.; HERSZÉNYI, L. The impact of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflammatory bowel diseases. **Digestive Diseases**, v. 30, n. 3, p. 289-295, 2012.

LARANJEIRA, P. V. E. H.; ALMEIDA, F. Q.; PEREIRA, J. S.; LOPES, M. A. F.; CAMPOS, C. H. C.; CAIUBY, L. C. A. B.; SOUZA, P. N. B. Perfil e distribuição da síndrome cólica em equinos em três unidades militares do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, p.1108–1115, 2009.

LASSEN, E. D.; SWARDSON, C. J. Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. **Veterinary Clinics of North America, Equine practice**. v. 11, n. 3, p. 351-389, 1995.

LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Analytical Biochemistry**, v. 249, n. 1, p.24-28, 1997.

LOPES, M. A. F.; DEARO, A. C. O.; BIONDO, A. W.; GODIN, L. F. P.; IAMAGUTI, P.; THOMASSIAN, A.; KOHAYAGAWA, A. Exame do fluido peritoneal e hemograma de equinos submetidos à laparotomia e infusão intraperitoneal de carboximetilcelulose. **Ciência Rural**. v. 29, n. 1, p. 79-85, 1999.

LÓPEZ, P. C. R.; OLIVELLA, W. R. M. Lesiones remotas ocasionadas por el síndrome isquemia-reperfusión en equinos, fisiopatología y alternativas terapéuticas. **Revista de Medicina Veterinária**, n. 17, p. 53–68, 2009.

LOURO, M. F. C.; DIAS, R. V. C.; SOTO-BLANCO, B. Avaliação do fluido peritoneal de asininos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 58, n. 5, p. 955–958, 2006.

MACHADO, G. F.; MELO, G. D.; MORAES, O. C.; SOUZA, M. S.; MARCONDES, M.; PERRI, S. H. V.; VASCONCELOS, R. O. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis **Journal Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 136, p. 340-345, 2010.

MACKAY, R.J. Endotoxemia. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**, 3ed. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 225-232.

MAIR, T.; DIVERS, T.; DUCHARME, N. Etiology, risk factors, and pathophysiology of colic – III. In: **Manual of Equine Gastroenterology**, cap. 8, p. 101-106, 2002.

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.

McKEEVER, K. H.; HINCHCLIFF, K. W. Neuroendocrine control of blood volume, blood pressure and cardiovascular function in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, p. 77–81, 1995.

McMICHAEL, M.; MOORE, R. M.; Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part I. **Journal of Veterinary Emergency and critical care**, n. 14, v. 4, p. 231-241, 2004.

McILWRAITH, C. W.; ROBERTSON, J. T.; TURNER, A. S. Surgery of gastrointestinal tract. In: _____. (2ed). **Equine surgery advanced techniques**. Philadelphia: Editora Lea&Febiger. 1998. p. 285-287.

MEDINA, C.; SANTANA, A.; QUINTERO, E.; RADOMSKI, M.; GUARNER, F. Metaloproteinasas de matriz en enfermedades del tracto gastrointestinal. **Gastroenterología Y Hepatología**, v. 27, n. 8, p. 491–497, 2004.

MEDINA, C.; RADOMSKI, M. W. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 3, p. 933–938, 2006.

MENDES, L. C.; PEIRÓ, J. M. Semiologia do sistema digestório equino. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: A arte do diagnóstico**. p.139-175, 2008.

METZE, K. Distúrbios da circulação. In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed). **Bogliolo – Patologia geral**. 2 edição. 1998. p. 80-110.

MICHELIS, C.; ARNOULD, T.; REMACLE, J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions – review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1497, p. 1-10, 2000.

MIRZA, M.H.; SEAHORN, T.L.; OLIVER, J.L.; HOSGOOD, G.; MOORE, R.M. Detection and comparison of nitric oxide in clinically healthy horses and those with naturally acquired strangulating large colon volvulus. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 2, p. 106-115, 2005.

MONTELLO, T. G.; CASTRO-JR, J. F. C.; SANTOS, V. P.; CHROSTO, E. C. S.; SILVA-FILHO, A. P. F. Alterações hematológicas observadas em equinos submetidos a laparotomia em estação e enterotomia do cólon menor. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 3, p. 201–205, 2004.

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

MORRIS, D. D. Alterations in the Leukogram. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. 4. Ed. St Louis: Mosby, 2009, cap. 25, p. 405-410.

MOSSERI, S.; HETZEL, U.; HAHN, S.; MICHALOUPPOULOU, E.; SALLABANK, H. C.; KNOTTENBELT, D. C.; KIPAR, A. Equine sarcoid: In situ demonstration of matrix metalloproteinase expression. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 2, p. 279–285, 2014.

MURRAY, R. C.; GREEN, E. M.; CONSTANTINESCU, G. M. Equine enterolithiasis. **Compendium on Continuing Education: Equine Practices**. v. 14, n. 8, p. 1104–1112, 1992.

MURRAY, M. J. Peritonitis. In: REED, S.; BAYLY, W. **Equine Internal Medicine**, WB Saunders: Philadelphia. 1998. p. 700-705.

NAGASE, H.; WOESSNER, F. Matrix Metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 31, p. 21491–21494, 1999.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Journal Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562-73, 2006.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 379-390, 2005.

NAVARRO, V. P.; NELSON-FILHO, P., ASSED, L.; SILVA, B. A participação das metaloproteínas da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da Unesp**. v. 35, n. 4, p. 233–238, 2006.

NISSINEN, L.; KÄHÄRI, V. M.; Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2571-2580, 2014.

NOGUEIRA, A. F. S. **Análise multivariada do leucograma e da resposta de fase aguda em equinos acometidos por síndrome cólica de origem natural ou experimental**. 2014. 61f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

OLIVEIRA, STAL. G.; CUNHA, A. L.; DUARTE, A. C.; CASTAÑON, M. C. M. N.; CHEBLI, J. M. F.; AGUIAR, J. A. K. Positive correlation between disease activity and matrix metalloproteinases activity in a rat modelo f colits. **Arquivo Gastroenterologia**, v. 51, n. 2, p. 107-112, 2014.

OLLIVIER, F. J.; BROOKS, D. E.; VAN SETTEN, G. B.; SCHULTZ, G. S.; GELATT, K. N.; STEVENS, G. R.; CUTLER, T. J. Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 6, p. 397–405, 2004.

O’SULLIVAN, S.; GILMER, J. F.; MEDINA, C. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: An Update. **Hindawi Publishing Corporation**. v. 2015, p. 1-19, 2014.

PAGE-McCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, n.3, p.221-233, 2007.

PAGLIOSA, G. M. **Lesões decorrentes de obstruções experimentais no jejuno de equinos tratados com glutamina ou associação de succinato sódico de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e ácido ascórbico.** 2009. 67f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2009.

PARKS, W.C.; WILSON, C. L; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 617-629, 2004.

PARRY, B.W.; BROWNLOW, M.A. Peritoneal fluid. In: ROBINSON, N.E. Cytology and hematology of the horse. **American Veterinary**. p. 121-151, 1992.

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

PINHEIRO, B.V.; HOLANDA, M. A.; ARAÚJO, F.G.; ROMALDINI, H. Lesão pulmonar de reperfusão. **Journal Pneumology**, v. 25, p. 124-136, 1999.

PIRILÄ, E., MAISI, P., SALO, T., KOIVUNEN, E., SORSA, T. In vivo localization of gelatinases (MMP-2 and -9) by in situ zymography with a selective gelatinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287, n. 3, p. 766–774, 2001.

PIRILÄ, E.; RAMAMURTHY, N. S.; SORSA, T.; SALO, T.; HIETANEN, J.; MAISI, P. Gelatinase A (mmp-2), Collagenase-2 (MMP-8), and laminin-5 γ 2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (Ulcerative Colitis). **Digestive Diseases and Sciences**, v.48, n.1, p. 93-98, 2003.

PORTO, C. D.; NUNES, L. C.; MASSENO, A. P. B.; SEQUEIRA, J. L.; OLIVEIRA, D. E.; ALVARENGA, M. A. Expressão de MMP-2 e MMP-9 no endométrio de éguas saudáveis e portadoras de endometriose crônica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 12-19, 2011.

PORTH, C. M; SOMMER, C. Inflamação, reparo tecidual e cura de feridas. In: PORTH, C. M.; MAFTIN, G. **Fisiopatologia.** 8 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010. v. 1, cap. 18, p. 389 – 411.

RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Journal Matrix Biology**, v. 26, n. 8, p. 587–596, 2007.

RAULO, S. M.; SORSA, T.; TERVAHARTIALA, T.; PIRILÄ, E.; MAISI, P. MMP-9 as a marker of inflammation in tracheal epithelial lining fluid (TELF) and in bronchoalveolar fluid (BALF) of COPD horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 2, p. 128–136, 2001.

RHOADS, W.S. Small colon impactions in adult horses. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. Princeton, v. 21, n. 6, p.770-775, 1999.

RILEY, S. C.; THOMASSEN, R.; BAE, S. E.; LEASK, R.; PEDERSEN, H. G.; WATSON, E. D. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion by the equine ovary during follicular growth and prior to ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3-4, p. 329–339, 2004.

ROSS, M. W.; HANSON, R. R. Large intestine. In: AUER, J. A. **Equine surgery**. 1992. p. 392–393.

ROWE, E. L.; WHITE, N. A. Reperfusion injury in the equine intestine. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia. v. 1, p. 148-162, 2002.

SANTSCHI, E.M.; SLONE, D. E.; GRONWALL, N.; JUZWIAK, J. S.; MOLL, H. D. Types of colic and frequency of postcolic abortion in pregnant mares: 105 cases (1984-1988). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 3, p.374-377, 1991.

SHAPIRO, S. D.; SENIOR, R. M. Matrix Metalloproteinases. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, p. 1100-1102, 1999.

SILOȘI, I., BOLDEANU, M. V.; MOGOANTĂ, S. Ș.; GHILUȘI, M.; COJOCARU, M.; BICIUȘCĂ, V.; COJOCARU, I. M.; AVRĂMESCU, C. S.; GHEONEA, D. I.; SILOȘI, C. A.; TURCULEANU, A. matrix metalloproteinases (MMP-3 and MMP-9) implication in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, v. 55, n. 4, p. 1317-1324, 2014.

SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, n. 3, v. 4, p. 367-378, 2004.

SIMONE, E. A.; PERRONE, G.; CAGGIANO, N.; LASTRA, Y.; RUBATINO, F.; DÍAZ, J.; FERRETO, A.; OCA, C. M.; ROLDÁN, E.; BARBARÁ, M. A. C. Levels of Cytokines and Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in the Synovial Fluid of Osteoarthritic Horses Treated With Pamidronate. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 7, p. 577–583, 2015.

SNOEK VAN BEURDEN, P. A. M.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, v. 38, n. 1, p. 73-83, 2005.

SNYDER J.R.; SPIER S.J. Abnormal conditions of the descending (small) colon. p. 774-775. In: Smith B.P. (Ed.), **Large Animal Internal Medicine**. p. 774-775, 1996.

SOUZA, A.P.; LINE, S.R.P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista Faculdade Odontologia Bauru**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.

SPIER, S.J.; SNYDER, J.R. Physical and laboratory evaluations of the horse with colic. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. 3 edição. p. 193, 1992.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Fundamentos de patologia clínica veterinária. **Eritrócitos**. In: _____. (2 ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011. cap. 3. p. 143.

TVEITA, A.; REKVIG, O. P.; ZYKOVA, S. N. Glomerular matrix metalloproteinases and their regulators in the pathogenesis of lúpus nephritis. **Arthritis Research & Therapy**. v. 10, n. 6, 2008.

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, 2011.

THOEFNER, M.B.; ERSBOLL, B.K.; JANSSON, N.; HESSELHOLT, M. Diagnostic decision rule for support in clinical assessment of the need for surgical intervention in horses with acute abdominal pain. **Canadian Veterinary Journal Research**, v. 67, n. 1, p. 20-29, 2003.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos Cavalos**. 4. ed. São Paulo. 2005. cap. 12, p. 295.

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

TULLENERS, E.P. Complications of abdominocentesis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.182, n. 3, p. 232-234, 1983.

URIBE, A. D. P.; VALADÃO, C. A. A.; SANTANA, A. E. Influência do azul de metileno nos sinais clínicos de equinos com obstrução experimental do jejuno associada a exposição ao lipopolissacarídeo (LPS). **Revista Ars Jaboticabal**, v. 24, n. 3, p. 148-152, 2008.

VALENTE, P. P. **Estudo comparativo de aspectos hemáticos e de características físico-químicas e citológicas do fluído peritoneal de equinos submetidos a enterorrafias 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, 2001.

VANDOOREN, P. E.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 48, n. 3, p. 222-272, 2013.

VERVUERT, I.; COENEN, M. Nutritional management in horses: selected aspects to gastrointestinal disturbances and geriatric horses. In: Proceedings European Equine Health & Nutrition Congress, 2, Netherlands, Lelystad. p. 20-30, 2003.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.

VOIGHT, G. L.; SWIST, S. L. Leukocyte cell types and functions. In: _____. 2. Ed. **Hematology Techniques e concepts for veterinary technicians**. Wiley-Blackwell, 2011, cap 8, p.83-98.

WEISER, G.; Interpretação da resposta leucocitária na doença. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015, cap. 12, p. 108-119,

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. Neutrophil distribution and function. In: _____. 6ed. **Schalm's Veterinary Hematology**. Iowa: Willey Blackwell, 2010. cap. 41, p. 268-274.

WELLES, E. G. Interpretation of equine leukocyte responses. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. Ames: Iowa, 2010. cap. 47, p. 314- 320.

WHITE, N. A. Epidemiology and etiology of colic. In _____. **The Equine Acute Abdomen**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 50-64.

WHITE, N.A. Prevalence, Demographics and Risk Factors for Colic. **Proc. American Association of Equine Practitioners Focus Meeting**, 2005.

WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **Journal Federation American Societies for Experimental Biology**, v. 5, p. 2145-2154, 1991.

WOESSNER Jr., J.F. The matrix metalloproteinase family. In: Parks, W.C., MECHAM, R.P. (Eds.), Matrix Metalloproteinases. **Academic Press**, Inc., San Diego, p. 1–14, 1998.

YOSHIDA, W. B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. **Revista Cirurgia Vascular e Angiologia**, n. 12, p. 82-95, 1996.

APÊNDICES

1. TÉCNICA DESCRITIVA PARA A PREPARAÇÃO DOS GÉIS

A princípio, preparou-se o gel de corrida a 10% (10 mL por gel), utilizando-se 4,0 mL de gelatina tipo A²⁵ (1mg/mL), 3,3 mL de solução de Acrilamida/Bisacrilamida (30:0,8), 2,5 mL de Tris-HCl pH 8,8 1M, 100 µL SDS 1% (p/v), 100 µL PSA 10% (p/v) e 4 µL de TEMED. Na sequência, procedeu-se o preparo do gel de empilhamento a 5% (3 mL por gel), utilizando-se 2,1 mL de água destilada, 500 µL de solução de Acrilamida/Bisacrilamida (30:0,8), 380 µL de Tris-HCl pH 6,8 1M, 30 µL de SDS 0,5% (p/v), 30 µL de PSA 10% (p/v) e 3 µL de TEMED, o qual foi adicionado sobre o gel de corrida.

Os géis foram mantidos dentro da cuba de eletroforese e esta foi preenchida com solução tampão de corrida 1X, pH 8,3 e gelado. A solução de tampão de corrida é constituída de Tris base 250 mM, Glicina 1,92 M, SDS 1% (p/v) e água destilada. Logo após, a cuba de eletroforese vertical²⁶ foi mantida em recipiente contendo gelo. Na sequência, para cada amostra experimental, preparou-se a solução contendo 10 µL de amostra contendo 15 µg de proteína total (diluída em água destilada) e 10 µL de tampão não desnaturante constituído por Glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,2% (p/v) e Tris-HCl 0,125 M pH 6,8. Amostras contendo ambas MMP-2 e MMP-9 previamente caracterizadas no laboratório foram usadas como controle positivo da zimografia.

Com isso, iniciava-se a eletroforese do gel de empilhamento a 110V e 50mA (25mA por gel), permanecendo por período de 20 minutos ou até a visualização da passagem das amostras para o gel de corrida. Neste ponto, alterava-se a voltagem para 125V e a mili-amperagem para 80mA (40mA por gel) e aguardava-se durante, aproximadamente, 3 horas até a completa migração das MMPs no gel. Após o término da corrida, os géis foram, minuciosamente, retirados da placa de vidro e, sem demora, lavados em solução de Triton X-100 2,5% (v/v)²⁷, por 30 minutos em temperatura ambiente, sob agitação lenta. Em seguida, o gel foi transferido para a solução de ativação enzimática, constituída por Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, NaN₃

²⁵ Sigma®, Saint Louis–MO, EUA.

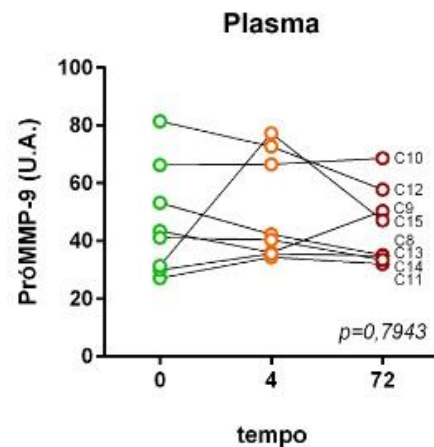
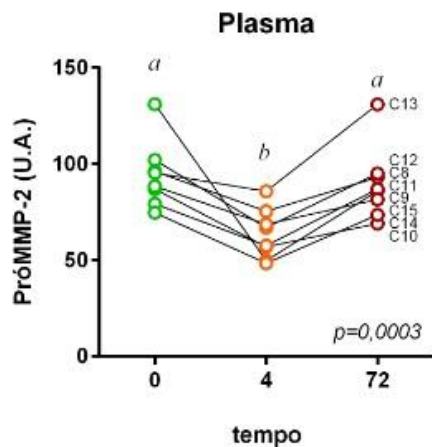
²⁶ MiniVeAmershamVertical Electrophoresis System®. GE Healthcare Life Sciences, Inglaterra.

²⁷ Sigma®, Saint Louis–MO, EUA.

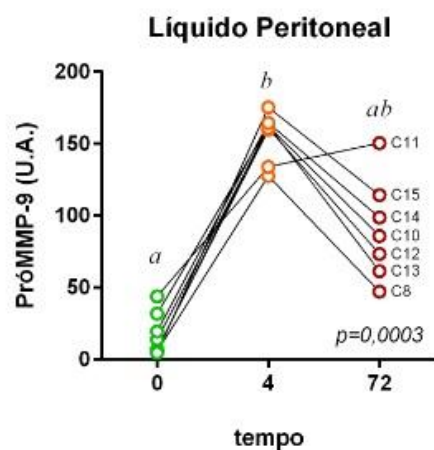
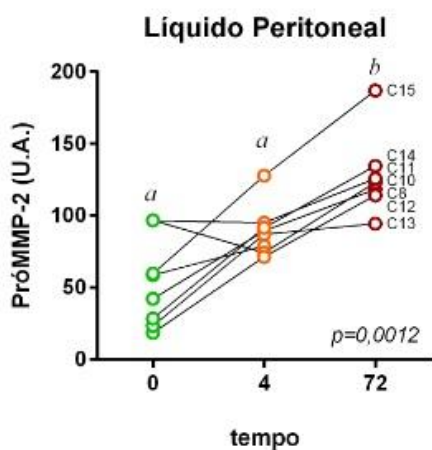
(azida sodica) 10 mM, Brij-35 0,2% (p/v) e água destilada (qsp) em pH 7,6, permanecendo incubado por 20 horas, em estufa a 37°C, sob constante agitação lenta .

Logo após, o gel era corado com solução contendo azul de Coomassie 0,5% e solução fixadora, composta por azul de Coomassie R-250 0,5% (p/v) diluído em solução fixadora (álcool metílico 50% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v) e água destilada), por 30 minutos. Após esta etapa, os géis foram descorados em solução descorante composta por álcool metílico 50% (v/v) e ácido acético glacial 10% (v/v), durante aproximadamente 40 minutos, para que fosse possível a percepção das bandas incolores, em contraste com o fundo azul do gel. E, finalizando, o gel era armazenado em água destilada a 4°C, por 24 horas, para melhorar o seu contraste.

2. GRÁFICOS REFERENTES À ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE METALOPROTEINASES 2 E 9 NO PLASMA E LÍQUIDO PERITONEAL DE EQUINOS



Apêndice 2A. Atividade gelatinolítica de PróMMP-2 e PróMMP-9 no plasma de todos os equinos empregados neste ensaio. Valores expressos em unidades arbitrárias (U.A), ao longo do tempo expresso em horas. Jaboticabal, 2015.



Apêndice 2B. Atividade gelatinolítica de PróMMP-2 e PróMMP-9 no líquido peritoneal de todos os equinos empregados neste ensaio. Valores expressos em unidades arbitrárias (U.A), ao longo do tempo expresso em horas. Jaboticabal, 2015.