

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

EFEITOS DA INFUSÃO DE AZUL DE METILENO EM
EQUINOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE
LIPOPOLISSACARÍDEO

José Henrique Saraiva Borges
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

EFEITOS DA INFUSÃO DE AZUL DE METILENO EM
EQUINOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE
LIPOPOLISSACARÍDEO

José Henrique Saraiva Borges

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

José Henrique Saraiva Borges, filho de Maria dos Anjos Saraiva de Andrade e Paulo Roberto Natividade Borges, é médico veterinário nascido no município de Niterói-RJ. Graduou-se em medicina veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2001, ano que também iniciou a Residência na área de Cirurgia e Anestesiologia de Grandes Animais na Universidade Estadual Paulista – campus de Jaboticabal. Em 2003 ingressou no mestrado no programa de Cirurgia Veterinária sob orientação do Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão. É membro da Sociedade Sul-mato-grossense de Medicina Veterinária e atua no estado do Mato Grosso do Sul como docente das disciplinas de Técnica Cirúrgica, Cirurgia e Anestesiologia desde 2005, ano que também iniciou o doutorado.

*Ando devagar
 Porque já tive pressa
 Levo esse sorriso
 Porque já chorei demais*

*Hoje me sinto mais forte
 Mais feliz quem sabe
 Só levo a certeza
 De que muito pouco eu sei
 Eu nada sei*

*Conhecer as manhas e as manhãs
 O sabor das massas e das maçãs
 É preciso amor pra poder pulsar
 É preciso paz para poder sorrir
 É preciso a chuva para florir*

*Penso que cumprir a vida
 Seja simplesmente
 Compreender a marcha
 Ir tocando em frente*

*Como um velho boiadeiro
 Levando a boiada
 Eu vou tocando os dias
 Pela longa estrada
 Eu vou*

*Conhecer as manhas e as manhãs
 O sabor das massas e as maçãs
 É preciso amor pra poder pulsar
 É preciso paz para poder sorrir
 É preciso a chuva para florir*

*Todo mundo ama um dia
 Todo mundo chora um dia
 A gente chega
 E o outro vai embora
 Cada um de nós
 Compõe a sua história
 Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
 De ser feliz.*

(Almir Sater e Renato Teixeira)

Dedico

À Vívian meu grande amor e a Rafaela, o fruto deste amor.

*“Você deixou seus sonhos para que eu sonhasse,
Derramou lágrimas para que eu fosse feliz,
Você perdeu noites de sono para que eu dormisse tranqüilo,
Acreditou em mim apesar dos meus erros.
Ser educador é ser um poeta do amor
Jamais esqueça que eu levarei para sempre
um pedaço do seu ser dentro do meu próprio corpo” (Augusto Cury)*

À minha mãe, dedico

Ofereço

A Deus por me dar o dom de amar os animais
e
aos cavalos, a mais sublime de suas criações.

Agradecimento

Aos meus irmãos Marcelo e Dario, companheiros de todos os momentos.

Ao meu pai, pelo apoio.

À minha avó Léa (*in memorian*) por ajudar em minha criação

Ao meu avô Loca (*in memorian*) exemplo de honestidade e simplicidade, de quem herdei o amor aos cavalos.

Ao meu tio Paulo e dindinha Ás pelo carinho e auxílio em minha criação.

Ao meu padrinho Quinho pelo carinho e dedicação.

Às minhas primas Rosana e Paula pela amizade e convivência fraterna.

Ao Prof. Valadão, exemplo de pai, amigo e professor: por tornar possível meu sonho e contribuir de maneira decisiva em minha formação.

À família Valadão (Tati, Lú, Dudu e Inez) pela convivência fraterna, mesmo quando roubávamos o Valadão por longos períodos.

À Inez, que com seu coração de mãe, sempre disposta a nos ajudar em os todos momentos, verdadeiro pilar do grupo Valadão *et al.*

Aos meus colegas de equipe Andrea e Luciana pela excelente convivência e ajuda em todas as fases do trabalho.

À Prof. Fabiana Sataque pela ajuda técnica e à amiga que descobri ao longo deste trabalho.

Aos meu alunos e orientados que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao veterinário e amigo Oberdam Tenório pela contribuição e amizade.

Ao Prof. Canola pela amizade, exemplo de profissionalismo e ensinamentos, que levarei sempre comigo.

Aos professores Cattelan e Lacerda pela amizade e contribuição na minha formação.

À equipe de funcionários do HV (Carlão, Edson, Zé Carlos, Beto, Laerte, Baiano, Tarciso e Zé das Cabras) pela amizade e ensinamentos nestes anos de convivência.

À equipe da esterilização Dona Celina, Seu Izaias e Roberto Bertanha, este sim o principal responsável pelos meus quilos a mais, pela amizade e ajuda.

À equipe da farmácia Luiza e Flávia, pela amizade e ajuda indispensável.

À equipe da limpeza Lauro e Miguel, companheiros de churrascos e a Seu Ivo exemplo de vida e alegria que estará sempre presente em minhas lembranças.

À equipe do laboratório Paulo, Renata e Cláudia pela amizade e paciência em nos ensinar.

Aos meus irmãos de república, pelas conversas, brincadeiras e churrascos.

Aos meus eternos amigos César, Fabinho, Danilo, Paulinho (*in memoriam*) e Henrique responsáveis pelos melhores momentos de minha vida. Sempre presentes, mesmo quando ausentes.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Câmpus de Jaboticabal e ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, pela acolhida e oportunidade de concretizarmos nossos ideais.

A UNIGRAN por me incentivar e me liberar sempre que preciso.

SUMÁRIO		Pagina
LISTA DE TABELA		11
LISTA DE FIGURA		13
RESUMO		15
ABSTRACT		16
1. INTRODUÇÃO		17
2. REVISÃO DA LITERATURA		19
3. MATERIAL E MÉTODOS		30
3.1. Animais.....		30
3.2. Preparo dos Animais		30
3.3. Delineamento Experimental.....		31
3.4. Procedimentos Experimentais		33
3.4.1 Frequência Cardíaca.....		33
3.4.2. Frequência Respiratória.....		33
3.4.3. Temperatura Retal		33
3.4.4. Tempo de Preenchimento Capilar		33
3.4.5. Volume Globular.....		34
3.4.6. Contagem de Hemácias.....		34
3.4.7. Hemoglobina.....		34
3.4.8. Contagem de Leucócitos.....		34
3.4.9. Proteínas Plasmáticas Totais.....		34
3.4.10. Fibrinogênio.....		34
3.4.11 Concentração Sérica de Glicose		35
3.4.12 Proteínas de Fase Aguda.....		35
3.4.13 Óxido Nítrico.....		35
3.4.17 Interleucina 6		36
3.4.18 Fator de necrose tumoral- α		37
3.5. Análise Estatística.....		37

4.	RESULTADOS.....	38
4.1	Frequência Cardíaca.....	38
4.2	Frequência Respiratória.....	38
4.3	Temperatura Retal	38
4.4	Tempo de Preenchimento Capilar	38
4.5	Volume Globular.....	43
4.6	Contagem de Hemácias.....	43
4.7	Hemoglobina.....	43
4.8	Contagem de Leucócitos.....	43
4.9	Proteínas Plasmáticas Totais.....	48
4.10	Fibrinogênio.....	48
4.11	Concentração Sérica de Glicose	48
4.12	Imuno Globulina A.....	52
4.13	Transferrina.....	52
4.14	Albumina.....	52
4.15	Imuno globulina G de cadeia longa.....	52
4.13	Óxido Nítrico.....	57
4.17	Interleucina 6	57
4.18	Fator de necrose tumoral- α	57
5.	DISCUSSÃO.....	61
6.	CONCLUSÕES.....	70
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELA

	Página
1 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia	25
2 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da frequência Respiratória (FR) (movimentos por minuto) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia	26
3 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da temperatura retal (TR, °C) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia	27
4 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) do TPC (segundos) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	28
5 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) do volume globular (L/L) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	30
6 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da contagem de hemácias ($\times 10^{12}/L$) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	31
7 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da concentração de hemoglobina (Hb; g/L) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	32
8 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da contagem de leucócitos ($\times 10^9/L$) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	33
9 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da concentração sérica da proteína total (PPT; g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	35
10 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da concentração de fibrinogênio (g/L) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	36

- 11** - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da concentração sérica de glicose (mg/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia **37**
- 12** - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da Ig A (g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia **39**
- 13** - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da transferrina (g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia **40**
- 14** - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da albumina (g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia **41**
- 15** - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da IgG de cadeia longa (g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **42**
- 16** - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) do Óxido Nítrico (NO) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia **44**
- 17** - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da atividade sérica da interleucina 6 (IL6) de equinos dos grupos LPS+AM e LPS+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **45**
- 18** - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da atividade sérica do fator de necrose tumoral- α (ITNF- α) de equinos dos grupos LPS+AM e LPS+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **46**

LISTA DE FIGURAS

		Página
1 –	Representação esquemática da administração das drogas durante o período experimental	17
2 –	Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da frequência cardíaca em batimentos por minuto de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	25
3 –	Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da frequência respiratória em movimentos por minuto de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	26
4 –	Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da temperatura retal (%TR, °C) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	27
5 –	Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão do TPC (segundos) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	28
6 –	Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão do VG (L/L) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	30
7 –	Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da contagem de hemácias ($\times 10^{12}/L$) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	31
8 –	Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da concentração de hemoglobina (g/L) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	32
9 –	Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da contagem de leucócitos ($\times 10^9/L$) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.	33
10 –	Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da PPT (%g/dL)	35

em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

- 11** – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão do fibrinogênio (g/L) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **36**
- 12** – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da concentração sérica de glicose (mg/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **37**
- 13** – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da Ig A (g/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **39**
- 14** – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da transferrina em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **40**
- 15** – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da albumina (%g/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia **41**
- 16** – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da IgG de cadeia longa (g/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **42**
- 17** – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão do óxido nítrico em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **44**
- 18** – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da atividade sérica da IL6 em equinos dos grupos LPS+AM e LPS+NaCl, ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia. **45**
- 19** – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da atividade sérica do TNF- α de equinos dos grupos LPS+AM e LPS+NaCl, ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia **46**

RESUMO - A endotoxemia é um distúrbio grave na clínica veterinária, sendo uma das principais causas de mortalidade em equinos. Trabalhos recentes relatam a eficácia do azul de metileno na prevenção dos danos impostos pelo óxido nítrico. Este estudo foi concebido com o fito de avaliar os efeitos do azul de metileno sobre as respostas clínica, celular e bioquímica, na endotoxemia experimental em equinos. Os animais foram divididos em três grupos. LPS+AM recebeu LPS e foi tratado com 3mg/kg de azul de metileno 60 minutos após a indução da endotoxemia; LPS+NaCl também recebeu LPS e foi tratado com 3mg/kg de azul de metileno 255 minutos após a indução da endotoxemia, e NaCl+AM que recebeu NaCl e foi tratado com azul de metileno 60 minutos após a infusão do NaCl. Foram realizados exames clínicos e laboratoriais durante 12 horas em quatro momentos. Observou-se aumento de temperatura, leucopenia e aumento no fibrinogênio nos animais pré-tratados com LPS, a partir do momento 90 minutos. Não foi possível afirmar se houve efeito benéfico do azul de metileno sobre a resposta dos equinos frente à endotoxemia experimental.

Palavras-chave: endotoxina, equino, azul de metileno

ABSTRACT – Endotoxemia is a severe disturbance in Veterinary Clinics and one of the most important causes of deaths in equine. Recent papers report the efficiency of methylene blue in preventing the damage caused by nitric oxide. The aim of this work was to study the effects of methylene blue in clinic, cellular and biochemistry responses in experimental endotoxemia of horses. The animals were divided in three groups. The group LPS+AM received LPS and was treated with 3mg/Kg of methylene blue 60 minutes after the induction of endotoxemia; LPS+NaCl also received LPS and was treated with 3mg/Kg of methylene blue 255 minutes after the induction of endotoxemia and NaCl+AM that received NaCl and was treated with methylene blue 60 minutes after NaCl infusion. Clinical and laboratorial exams were done in four moments during 12 hours. There was an increase in temperature levels, leucopenia and increase in fibrinogen in the animals treated with LPS, beginning within 90 minutes. It was not possible to affirm if there was any benefit in the use of methylene blue in inflammatory response of horses with induced endotoxemia.

Keywords: Equine, endotoxin, methylene

1 INTRODUÇÃO

A domesticação dos equinos acarretou alterações significativa nos seu habitat, bem como em sua dieta. Os animais que percorriam longas distâncias e ingeriam pequenas porções de gramíneas ao longo do dia, passaram a viver estabulados e ingerir excesso de carboidrato, divididos em poucas porções. Este processo de domesticação promoveu aumento significativo nos casos de cólica eqüina, uma síndrome que normalmente cursa com distúrbio no trato gastrintestinal, e endotoxemia associada (MOORE, 1990)

A endotoxemia é um distúrbio grave na clínica veterinária, causando considerável mortalidade entre os animais acometidos, com efeitos mais evidentes na espécie equina. Esta afecção está associada à ação de complexos lipopolissacarídicos (LPS) presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas (ASTIZ et al., 1995). Em equinos frequentemente está associada aos problemas gastrintestinais, sobretudo à cólica. Seu surgimento, em geral, deve-se ao processo septicêmico provocado por bactérias Gram-negativas. A endotoxemia é encontrada em outras situações tais como nos casos de choque hemorrágico, queimaduras extensas, desnutrição protéica e icterícia obstrutiva (SOUZA, 2003).

Muitos dos efeitos deletérios promovidos pelo lipopolissacarídeo (LPS) podem estar associados a liberação de citocinas e óxido nítrico (NO). Nos estados de choque endotoxêmico e histaminérgico há liberação de mediadores inflamatórios, com destaque para a histamina e a bradicinina. A liberação maciça destes mediadores induzem à produção de óxido nítrico, que, por sua vez, promove vaso dilatação. Mais recentemente descobriu-se que o azul de

metileno (AM) age como bloqueador seletivo da guanilato-ciclase, inibindo com isso, a síntese de NO (PREISER et al.,1995).

Isto posto, face ao desconhecimento dos efeitos do azul de metileno em resposta endotoxêmica de equinos, objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos desta substância na endotoxemia induzida em equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O estudo da endotoxina iniciou-se no final do século XIX, quando Pfeiffer, descobriu que o lisado de *Vibrio cholerae* inativado pelo calor, continha um princípio tóxico capaz de induzir choque e morte em animais de laboratório, denominado de endotoxina (BAYSTON & COHEN, 1990).

Esta substância é constituída de uma porção lipopolissacarídica presente na membrana celular de bactérias gram negativas, que pode se apresentar de forma livre após a lise bacteriana (BRODGEN & PHILLIPS, 1988). O LPS apresenta em sua estrutura molecular três regiões bem distintas: uma cadeia lateral O-específica, um núcleo (“core”) oligossacarídeo e um lipídeo A (RIETSCHEL et al., 1982). O lipídeo A, que possui capacidade ligadora à membrana (COLATTOS, 1995) é biologicamente ativo e confere propriedades tóxicas a molécula; a região lateral O é variável segundo a cepa bacteriana e contém os determinantes antigênicos que definem sorologicamente a molécula de LPS (MacKAY, 1992).

Como a microbiota intestinal de cavalos saudáveis é constituída, na sua maioria, por bactérias gram negativas, a endotoxina é facilmente encontrada no intestino desses animais. Dados obtidos por MOORE et al. (1979) relatam concentrações de até 80µg/ml de endotoxina no fluido cecal de equinos clinicamente normais. Já segundo Mackay (1992) mais de 2,0g podem ser encontrados no mesmo conteúdo, porém pequena quantidade chega à circulação, devido à barreira presente na mucosa intestinal. Fisiologicamente essa pequena quantidade de endotoxina absorvida é prontamente detoxificada no fígado (BURROWS, 1981), sendo eliminada da circulação pelas células do

sistema fagocítico-mononuclear do fígado (FREUDENBERG et al., 1985), ou por anticorpos neutralizantes (ZIEGLER et al., 1982).

Quando a quantidade de endotoxina aumenta na circulação e suplanta a capacidade de detoxificação do fígado, pode exercer efeitos deletérios (HENRY & MOORE, 1990). A severidade dos efeitos está diretamente relacionada com o grau de endotoxemia (MOORE et al., 1981b). MacKAY (1992) relata que a passagem de apenas 1µg de endotoxina para a circulação é suficiente para causar febre e leucopenia em equinos. VALADÃO (2005), relata que doses de 0,03 até 0,1µg/Kg, são suficientes para causar hipertensão pulmonar e diminuir o fluxo sanguíneo para os tecidos intestinais, sem contudo, causar hipotensão arterial sistêmica e provocar choque em equinos.

Apesar da endotoxina permanecer intimamente associada à membrana externa, da bactéria viva, ela é liberada quando ocorre rápida replicação bacteriana, bem como lise ou morte do microorganismo (HENRY & MOORE, 1990; OLSON et al.,1995). Nas infecções locais ou sistêmicas, como pleurite, pneumonia, peritonite, metrite e colite, causadas por bactérias Gram-negativas, há produção de grande quantidade de endotoxina livre e, conseqüentemente intensa absorção da substância (FESSLER et al., 1989; MOORE & MORRIS, 1992).

Quando absorvidas, as endotoxinas iniciam diversas respostas sistêmicas, como estímulo imediatamente das plaquetas a liberar substâncias vasoconstritoras. HENRY & MOORE (1990) citam também que, durante a endotoxemia, há liberação do ácido araquidônico, pela ação da fosfolipase. Este por sua vez pode ser degradado por duas vias distintas, a da ciclooxigenase, que produz prostaglandina e tromboxanos ou a da

lipoxigenase, que produz leucotrienos. Durante a endotoxemia, devido à lesão endotelial, há início prevalência inicial da atividade de tromboxano, resultando em vasoconstrição difusa, agregação plaquetária, microtrombose e em consequência disso isquemia, levando à hipoxemia arterial e hipertensão pulmonar, devido à ação do tromboxano A_2 . A isquemia promovida pela endotoxina pode estar associada também ao íleo paralítico, à insuficiência renal aguda e à laminite (HENRY & MOORE, 1990).

A lesão endotelial aumenta a permeabilidade vascular, com liberação de prostaciclina que estimula os neutrófilos, especialmente nos pulmões e no seguimento intestinal onde ocorreu a injúria (SANGEETA et al., 2003).

As ações do sistema de defesa desencadeado pela endotoxemia, que deveriam ser benéficas, na verdade a imunomodulação efetiva e as propriedades endotóxicas prejudiciais são próximas. A ação excessiva da endotoxina sobre a cascata imunoinflamatória pode produzir alterações irreversíveis desencadeados por fatores imunomodulatórios fisiológicos, como no caso das citocinas endógenas (MOORE & BARTON, 1998).

A endotoxina age sistemicamente promovendo a liberação de metabólitos do ácido araquidônico, serotonina, bradicinina, fator ativador de plaquetas (PAF), β -endorfinas, fatores de complemento, fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulador de colônias (CSF), histamina, renina/angiotensina, catecolamina, atividade pró-coagulante, fator de depressão miocárdica, interleucina 1 (IL-1) e interferon. Esses mediadores acionam diversas cascatas biológicas que resultam nos efeitos nocivos da endotoxemia (FONG & LOWRY, 1990 ; GALVANI et al., 1999).

O lipídio A do LPS induz uma cascata de eventos que se inicia com a agressão à membrana celular, incluindo as células endoteliais, leucócitos e plaquetas, ativando o mecanismo de coagulação, podendo levar a coagulação intravascular disseminada (CID). As plaquetas lesionadas liberam histamina, serotonina e adrenalina (COTRAN et al., 2000). Estudos realizados com mediadores lipídicos como o fator agregador de plaquetas (PAF), das prostaglandinas, dos tromboxanos e dos leucotrienos, demonstraram efeitos importantes durante a endotoxemia e assim como o óxido nítrico (NO), parecem ser responsáveis por muitas outras respostas além de hipotensão (MOORE, 2001). Além disso, neutrófilos e plaquetas são sequestrados na microcirculação, onde podem juntamente com as células endoteliais, macrófagos e monócitos circulantes, contribuir para a injúria vascular (OLSON et al., 1995).

Três produtos dos fagócitos mononucleares: leucotrienos, IL-1 e TNF foram largamente estudados. A IL-1 desencadeia a resposta febril, é responsável também pelo início do metabolismo do ácido araquidônico, através da estimulação da atividade da fosfolipase. Além disso, a IL-1 inicia os efeitos proteolíticos do estresse, o que resulta na redução da massa muscular, gliconeogênese e síntese de proteína da fase aguda no fígado (MOORE, 1990).

MORRIS et al (1991) observaram o aumento na concentração sérica do TNF após a aplicação do LPS, alcançando picos entre 90 e 120 minutos após a aplicação do LPS. Descreveu seu papel na patogênese do choque endotoxêmico, pois administrou o TNF purificado em animais de laboratório e provocou a maioria das alterações associadas com a endotoxemia, observando

ainda que a ação de anticorpos monoclonais anti-TNF, preveniu a maioria dos efeitos deletérios da endotoxemia.

Os monócitos/macrófagos e linfócitos T e B são as principais fontes secretoras de TNF- α , no entanto, outras células são capazes de sintetizá-lo, incluindo células de Kupffer, neutrófilos, mastócitos, células endoteliais entre outras (VAN der POLL & LOWRY, 1995).

A via alternativa do complemento também pode ser ativada pela ação da endotoxina, promovendo a liberação de β -endorfinas, um opióide endógeno com atividades analgésicas e vasodilatadoras. WILD et al. (1984) demonstraram que antagonistas de opióides melhoram a hemodinâmica durante a endotoxemia.

Uma série de respostas hemodinâmicas, hematológicas e metabólicas ocorrem em equinos com endotoxemia (HENRY & MOORE, 1990). A endotoxemia estimula as células endoteliais a expressarem receptores para glicoproteínas da superfície de neutrófilos, promovendo a aderência destes no endotélio vascular, levando a um quadro de leucopenia. Uma vez ligados, os neutrófilos marginados são ativados pela exposição a mediadores inflamatórios, agredindo o endotélio vascular, tornando-o permeável (CARGILE et al., 1995).

Equinos com endotoxemia apresentam alterações clínicas importantes, tais como anormalidade na coloração das membranas mucosas e surgimento de linha tóxica ao redor dos dentes; aumento do tempo de preenchimento capilar; elevação das frequências cardíaca e respiratória; diminuição dos borborigmos intestinais; febre; hemoconcentração e trombocitopenia. Alguns equinos podem apresentar significativas dores abdominais, alguns animais

podem apresentar-se prostrados enquanto o processo se desenvolve (CAMPEBELL et al., 2007).

De acordo com MOORE (1990) os primeiros sinais da endotoxemia são taquicardia, dispnéia, hipóxia, alterações de perfusão e dor abdominal. Na fase inicial onde predomina a ação das tromboxanas observa-se mucosas pálidas e tempo de preenchimento capilar (TPC) de normal a reduzido. Em poucas horas, a via do ácido araquidônico, direciona-se para a síntese de substâncias vasodilatadoras, aumentando o TPC. Nesta a hipotensão e a hemoconcentração são evidentes. VALADÃO et al. (1995) observaram febre e aumento das frequências respiratória e cardíaca três horas após a indução da endotoxemia experimental

Estudos realizados por MATHISON et al. (1988) relataram que quando injetado em animais, o LPS se liga às lipoproteínas plasmáticas de alta densidade, albumina do soro, componentes do complemento além de uma proteína de fase aguda chamada de proteína ligadora de LPS (LBP). A interação entre a endotoxina e esta proteína torna a endotoxina incapaz de estimular os componentes celulares, ou de ser removida da circulação. Esta lipoproteína de alta densidade funciona como um mecanismo para inibir os efeitos deletérios das endotoxinas (CAMPEBELL, 2003).

A LBP é sintetizada no fígado e geralmente é encontrada em pequenas quantidades na circulação, porém, em resposta de fase aguda sua concentração pode aumentar muito (MOORE, 2001). O receptor de superfície, CD14, é um dos maiores receptores de superfície celular para endotoxina (MOORE, 1999). Apesar deste receptor ter função central na resposta celular, não possui habilidade para transmitir o sinal da endotoxina para o interior da

célula. O início do processo endotoxêmico se dá através da interação entre o lipopolissacarídeo e o receptor CD14, presente em monócitos, macrófagos e neutrófilos. A proteína ligante encontrada no LPS facilita a transferência da endotoxina para o receptor CD14. PEIRÓ (2002), explica que nas células que não expressam o CD14, tais como as endoteliais, os receptores CD14 solúveis (sCD14) atuam como ponte para o reconhecimento de superfície do complexo LPS – CD14.

Apesar das pesquisas nos últimos anos a cerca da endotoxemia, a molécula que reconhece o complexo LPS-sCD14 ainda não foi identificada nas células CD14. Além disso, o receptor CD14 não possui uma porção citoplasmática e para realizar as ligações existe um receptor *toll-like 4*, o qual é responsável pela transdução do sinal do complexo LPS-CD14 para o interior da célula (PEIRÓ, 2002).

Segundo MEANS et al. (2000) citado por PEIRÓ (2002), explicam que os receptores *toll-like* representam uma família de receptores para o reconhecimento da resposta imune inata, sendo que estes estão associados com a via de sinalização, o que resulta na ativação dos genes que expressam a resposta imune inata. PEIRÓ (2002), no entanto, ressalta que a necessidade do receptor CD14 ocorre apenas quando as endotoxinas estão em pequenas concentrações, pois, quando altas doses de LPS estão presentes no organismo, há estimulação das células independente deste receptor.

A IL-6 é produzida e secretada por monócitos/macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, linfócitos T e mastócitos (KISHIMOTO, 1992), que são estimulados pela IL-1, TNF- α , fator de crescimento derivado de plaquetas. O principal efeito pró-inflamatório desta citocina é a indução da

produção de proteínas de fase aguda, tais como o fibrinogênio, a proteína C reativa, a ferroxidase, o complemento, entre outras. A IL-6 estimula o crescimento e diferenciação das células B e age como co-estimuladora de células T. Concentrações altas de IL-6 têm sido mensuradas em soro e líquidos corpóreos de humanos e animais, após a administração de endotoxina. Aumentos nas concentrações de IL-1 e TNF- α também foram descritos após infecção bacteriana aguda (JABLONS et al., 1989). Enquanto os efeitos da IL-1 e do TNF- α podem ser prejudiciais ao hospedeiro, as ações da IL-6 parecem ser benéficas, pois os fatores da fase aguda protegem o hospedeiro contra microrganismos, além da IL-6 não causar injúria tecidual (GREEN & ADAMS, 1992).

O óxido nítrico é um gás radical livre, solúvel de curta duração, produzidos por diversas células, que regula a liberação de neurotransmissores no sistema nervoso central. É um mediador intercelular (IGNARRO et al., 1987), que também é utilizado por macrófagos para destruir agentes agressores (KUMAR et al., 2008).

O NO é sintetizado a partir da ativação de receptores de membrana, que mobilizam cálcio no interior das células endoteliais. O cálcio é um cofator importante, pois ele se liga a proteína calmodulina, estimulando assim a enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta enzima converte a L-arginina em L-citrulina, liberando com esta reação o ON (PALMER et al., 1988). Porém, existem NOS que atuam de forma independente do Ca^{++} (HIBBS et al., 1987)

HIBBS et al. (1987) relatam que as NOS dependente de Ca^{++} possuem função constitutiva, enquanto as que não necessitam de Ca^{++} são associadas a

ação inflamatória. Foram descritas três isoformas de óxido nítrico sintase, com diferentes distribuições nos tecidos. O tipo I é NOS neuronal, sem função no processo inflamatório. O tipo II trata-se de uma enzima presente em macrófagos, neutrófilos, células de Kupffer, hepatócitos, miócitos cardíacos, epitélio respiratório e células endoteliais, que produzem NO nas reações inflamatórias. O tipo III encontra-se normalmente no endotélio e tem função constitutiva (KNOBEL, 1996).

Atualmente sabe-se que o NO desempenha múltiplos papéis na inflamação, incluindo vasodilatação, antagonismo à agregação plaquetária, redução no recrutamento de leucócitos e ação citotóxica para destruição de bactérias (KUMAR et al., 2008). CRISTOL et al. (1993) descreve que o NO promove aumento do fluxo de sangue em tecidos com hipóxia. Este aumento ocorre em virtude da ação vasodilatadora do ON, pois ele promove aumento nos níveis de Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato (GMPc) na musculatura lisa dos vasos, levando a um relaxamento desta (FEELISCH & NOACK, 1991)

Recentemente a utilização do azul de metileno (AM: fórmula molecular: C₁₆H₁₈ClN₃S) em pacientes humanos, endotoxêmicos, visa diminuir a síntese de NO. Sabe-se que a produção do NO é dependente da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) sobre a L-arginina, que ativa a guanilato ciclase solúvel, desencadeando uma reação que culmina na liberação de GMP cíclico, levando a uma redução na quantidade de cálcio intracelular. O AM inibe a ativação da guanilato ciclase solúvel, diminuindo, portanto, de uma forma acentuada, os efeitos periféricos do NO (PREISER et al., 1995)

O AM foi considerado e utilizado inicialmente, “in vitro”, como bloqueador seletivo da guanilato ciclase em tecido muscular liso. Está claro atualmente que também inibe a óxido nítrico sintase e inativa diretamente o NO. Há relatos sobre os benefícios na utilização do AM para tratar vasoplegias em cirurgias cardíacas e no choque anafilático. Estudos demonstram que a inibição do NO pelos análogos da L-arginina revertem a hipotensão (MENARDI et al., 2006). THIEMERMAN (1993) relata que a utilização de inibidores da NOS tem apresentado bons resultados em pacientes hipotensos, devido ao choque endotoxêmico, mesmo quando refratário a terapia com vasoconstritores.

A resposta inicial do organismo durante o processo inflamatório decorrente de infecções, traumatismos, endotoxemia, isquemia e procedimentos cirúrgicos incluem várias alterações fisiológicas denominadas resposta de fase aguda da inflamação (TAKIGUCHI et al., 1990), que inclui a modificação do metabolismo hepático, com aumento da produção de glicoproteínas denominadas proteínas de fase aguda (TAKIGUCHI et al., 1990; GODSON et al., 1996). Como a concentração plasmática de proteínas de fase aguda é diretamente proporcional ao grau de lesão tecidual ou de inflamação (KENT, 1992), o proteinograma plasmático pode ajudar no diagnóstico de quadros clínicos suspeitos de septicemia e ou endotoxemia, não raros nas complicações pós-operatórias em equinos (TAKIGUCHI et al., 1990), e auxiliar no diagnóstico e prognóstico das enfermidades de abdome agudo, em estado de hidratação, risco cirúrgico e tipo e duração do processo inflamatório.

As proteínas de fase aguda podem ser classificadas como positivas ou negativas (KANEKO et al., 1997). No primeiro grupo enquadram-se, dentre

outras, fibrinogênio, glicoproteína ácida e haptoglobulina (TAKAGUCHI et al., 1990; TRUMEL et al., 1996), as quais se elevam imediatamente após a instalação do processo inflamatório e ou endotoxêmico (GODSON et al., 1996), decrescendo rapidamente com a regressão da lesão (KENT, 1992). As principais proteínas de fase aguda negativa cujas concentrações séricas tendem a decrescer nas reações inflamatórias têm como principais representantes a albumina e a transferrina (KANEKO et al., 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 12 equinos (oito machos castrados e quatro fêmeas), sem raça definida, considerados hígidos após realização de exame físico e hemograma completo. A idade dos animais variou entre quatro e oito anos, com peso entre 300 e 400 kg e escore corporal de três a quatro, em escala de um a cinco, de acordo com SPEIRS (1997). Os equinos foram vermifugados com 200 mcg/kg de ivermectina¹ e mantidos por 15 dias em piquete coletivo, com suplementação à base de feno de coast cross (*Cynodon dactylon*), ração comercial² na proporção de 1% do peso corporal, sal mineral³ e água *ad libitum*.

3.2 Preparo dos Animais

Os animais foram submetidos a jejum alimentar durante doze horas antes do início do experimento. Subsequentemente, foram contidos em tronco individual realizada tricotomia de uma área de 10 X 5 cm, no terço médio das regiões cervicais direita e esquerda, para a cateterização transcutânea das veias jugulares correspondentes. Após tricotomia e anti-sepsia local com iodopolivinilpirrolidona, foram introduzidos cateteres de náilon calibre 14G⁴ em ambas jugulares. Os fármacos foram administrados através do cateter implantado na veia jugular esquerda, e colheitas das amostras de sangue foram realizadas através do cateter implantado na jugular direita.

¹ Ivermectina Ouro Fino, pasta – Ouro Fino Agronegócio – Cravinhos/SP

² Royal Horse Rodeio Socil – Copyright Socil Evialis Nutrição Animal Indústria e Comércio Ltda- São Paulo/SP

³ Real Equino – Real H – Campo Grande/MS

⁴ Abbocath – Abbott Laboratórios -São Paulo-SP, Brasil.

3.3 Delineamento Experimental

Administração do LPS - Os animais dos grupos LPS + AM e LPS + NaCl, no dia do experimento, foram contidos em tronco e feita a administração, pela via intravenosa de lipopolissacarídeo de *E. coli* 055:B5, na dose de 50ng/kg diluído em 50mL de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%, durante um período de 15 minutos. Esse procedimento foi feito no período da manhã, entre 7:30 e 8:00 horas.

Grupos experimentais – Os animais foram separados igualmente (n=4) ao acaso em três grupos: Grupo lipopolissacarídeo + azul de metileno (LPS + AM), grupo lipopolissacarídeo + NaCl a 0,9% (LPS + NaCl) e grupo azul de metileno + NaCl a 0,9% (AM + NaCl).

No grupo LPS + AM após o término da administração intravenosa do LPS⁵, aguardou-se uma hora e, subsequentemente, aplicou-se solução de AM⁶ a 1%, na dose 3mg/kg, também pela via intravenosa, durante um intervalo de 15 minutos. Três horas após o término desta administração, administrou-se, também por via intravenosa, solução de cloreto de sódio 0,9%⁷, no mesmo volume da solução de AM.

No grupo LPS + NaCl após o término da administração do LPS⁸ por via intravenosa, aguardou-se uma hora para, subsequentemente, aplicar-se por via intravenosa, durante um intervalo de 15 minutos, solução de cloreto de sódio

⁵ *E. coli* 055:B5 (Sigma) -São Paulo-SP, Brasil.

⁶ Azul de Metileno (Sigma) -São Paulo-SP, Brasil.

⁷ Solução de NaCl 0,9%- Lab. Farmacêutico Ltda, Aquiraz-CE

⁸ *E. coli* 055:B5 (Sigma) -São Paulo-SP, Brasil.

0,9%⁹, no mesmo volume da solução de AM. Três horas após a administração da solução de NaCl administrou-se, uma solução de NaCl e AM¹⁰ a 1%, na dose 3mg/kg.

No grupo AM + NaCl uma hora após a administração de 50mL de solução de NaCl a 0,9%, infundi-se azul de metileno, por 15 minutos pela via intravenosa diluído em NaCl na mesma dose concentração dos grupos anteriores. Três horas após a administração do azul de metileno administrou-se o mesmo volume de NaCl (figura 1).

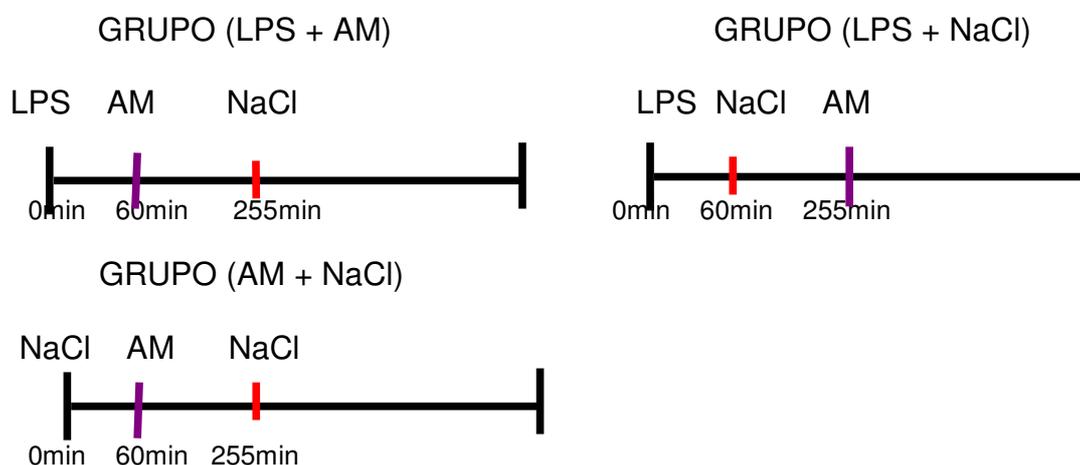


Figura 1 – Representação esquemática da administração das drogas durante o período experimental.

Colheita das amostras - As amostras de sangue foram colhidas imediatamente antes da infusão de 50mL de solução de LPS ou NaCl (T-15), 90 minutos após o término da infusão de 50mL de solução de LPS ou NaCl (T90), 285 minutos após a infusão de 50mL de solução de LPS ou NaCl (T285), o último momento foi colhido 720 minutos após a infusão de 50mL de solução de LPS ou NaCl (T720).

⁹ Solução de NaCl 0,9%- Lab. Farmacêutico Ltda, Aquiraz-CE

¹⁰ Azul de Metileno (Sigma) -São Paulo-SP, Brasil.

Imediatamente após a colheita de sangue, a amostra foi encaminhada ao laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade da Grande Dourados (UNIGRAN). O sangue foi acondicionado em tubos de vacutainer contendo anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético dissódico a 10%).

3.4. Procedimentos Experimentais

3.4.1 Frequência Cardíaca (FC)

A frequência cardíaca (FC, batimentos/min) foi determinada por meio de auscultação, com auxílio de estetoscópio, ao longo de um minuto, no quarto espaço intercostal da região para-esternal esquerda.

3.4.2 Frequência Respiratória (FR)

A frequência respiratória (movimentos por minuto) foi avaliada por observação da movimentação do gradil costal durante um minuto.

3.4.3 Temperatura retal (TR, °C)

A temperatura retal foi mensurada com termômetro clínico digital convencional ¹¹.

3.4.4 Tempo de preenchimento capilar (TPC, segundos)

O tempo de preenchimento capilar foi obtido por compressão da mucosa oral da arcada superior, determinando-se o tempo em segundos para o desaparecimento da impressão digital.

¹¹ Incoterm Indústria de Termômetros Ltda. – Porto Alegre/RS.

3.4.5 Volume globular (VG, L/L)

O volume globular foi obtido pela técnica do microhematócrito, utilizando-se a centrífuga de microhematócrito¹².

3.4.6 Contagem de hemácias ($\times 10^{12}/L$)

A contagem de hemácias foi obtida através da diluição das amostras em diluidor automático¹³ e leitura em contador de células automático¹⁴.

3.4.7 Concentração de hemoglobina (Hb, g/L)

A concentração de hemoglobina foi determinada através da diluição das amostras em diluidor automático e leitura em contador de células automático

3.4.8 Contagem de leucócitos ($\times 10^9/L$)

A contagem de leucócitos foi determinada por meio da diluição das amostras em diluidor automático e leitura em contador de células automático.

3.4.9 Proteínas plasmáticas totais (PPT, g/dL)

A concentração de proteínas plasmáticas totais foi determinada pela técnica de precipitação pelo calor e a leitura realizada em refratômetro portátil¹⁵.

3.4.10 Fibrinogênio (g/L)

A concentração de fibrinogênio foi obtida pela técnica de precipitação pelo calor e a leitura realizada em refratômetro portátil⁷.

¹² Centrífuga de microhematócrito, QUIMIS, Diadema - SP – Brasil

¹³ Diluidor automático DA 500, CELM, Barueri - SP – Brasil

¹⁴ Contador de células CC 530, CELM, Barueri - SP – Brasil

¹⁵ Refratômetro de mão QUIMIS Diadema - SP – Brasil

3.4.11 Concentração de glicose sérica (mg/dL)

A concentração sérica de glicose foi mensurada pelo método enzimático-colorimétrico, mediante o uso de conjuntos de reagentes comerciais¹⁶ e leitura em densitômetro semi-automático¹⁷, em comprimentos de onda específicos para cada constituinte.

3.4.12 Quantificação das concentrações séricas de proteínas de fase aguda

Para a separação das proteínas séricas foi realizado o fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e os resultados foram analisados por densitometria.

3.4.13 Óxido nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada pelo método nitrato/nitrito, a partir de amostras de sangue colhidas em tubos estéreis contendo heparina sódica, centrifugadas a 1500 x g por 10 minutos e o plasma sobrenadante foi coletado, aliquoteado e estocado em tubos de polipropileno em freezer - 70 °C até serem analisadas para a concentração de NO.

Uma alíquota de plasma de cada animal foi descongelada em temperatura ambiente e em local escuro durante 20 a 30 minutos. O volume de 50 µL de cada amostra foi transferido para tubos de polipropileno e desproteïnizada pela adição de 100 µL de etanol. A solução foi homogeneizada e deixada em descanso durante 30 minutos no freezer a - 20 °C. em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 X g, durante 5 minutos, a

¹⁶ Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte-MG-Brasil

¹⁷ Densitômetro semi-automático Bioplus BIO-200, São Paulo-SP-Brasil

temperatura de 25 °C, e o sobrenadante foi retirado para realização imediata da medida do nitrito. A medida da concentração do NO foi realizada utilizando um sistema de detecção eletroquímica de NO.

As dosagens de óxido nítrico foram realizadas no Laboratório da Escola de Enfermagem da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3.4.14 Interleucina 6 (IL-6)

A atividade sérica da IL-6 foi quantificada através do teste de ELISA simplificado¹⁸, seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, o padrão foi colocado na posição A1/A2 a H1/H2. Adicionou-se 150 µL de água destilada, em duplicata, em todos os poços contendo o padrão e também nos poços reservados ao branco. A partir da coluna 3, 100 µL de água destilada, em duplicata, foram adicionados aos poços reservados para as amostras a serem testadas. Em seguida, adicionou-se 50 µL de cada amostra, em duplicata, nestes poços. As placas foram cobertas e incubadas durante 3 horas em temperatura ambiente (25° C). A remoção do sobrenadante e a lavagem dos poços foi repetida 4 vezes com um tampão de lavagem. Após esta etapa, 100 µL de uma solução de substrato TMB foram adicionados em todos os poços, inclusive para o branco. As placas foram incubadas em temperatura ambiente (25° C) durante 15 minutos. Para finalizar a reação, 100 µL da solução de bloqueio foram adicionados em todos os poços, incluindo-se os brancos. As placas foram lidas em um leitor de ELISA a 450 nm.

18 IL-6 Human Biotrak Easy ELISA, GE Healthcare, RPN5968, Viena, Áustria.

3.4.15 Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)

A atividade sérica do TNF- α foi quantificada através do teste de ELISA simplificado, seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, o padrão foi colocado na posição A1/A2 a H1/H2. Adicionou-se 150 μ L de água destilada, em duplicata, em todos os poços contendo o padrão e também nos poços reservados ao branco. A partir da coluna 3, 100 μ L de água destilada, em duplicata, foram adicionados aos poços reservados para as amostras a serem testadas. Em seguida, adicionou-se 50 μ L de cada amostra, em duplicata, nestes poços. As placas foram cobertas e incubadas durante 3 horas em temperatura ambiente (25° C). A remoção do sobrenadante e a lavagem dos poços foi repetida 4 vezes com um tampão de lavagem. Após esta etapa, 100 μ L de uma solução de substrato TMB foram adicionados em todos os poços, inclusive para o branco. As placas foram incubadas em temperatura ambiente (25° C) durante 15 minutos. Para finalizar a reação, 100 μ L da solução de bloqueio foram adicionados em todos os poços, incluindo-se os brancos. As placas foram lidas em um leitor de ELISA a 450 nm.

3.5 Análise Estatística

Os dados obtidos na fase experimental foram submetidos à análise de variância empregando-se o software Sigma Stat®. Na avaliação das diferenças das médias ao longo do tempo dentro de cada grupo, utilizou o teste de Student-Newman-Keuls. A comparação entre os grupos, nos diferentes intervalos, foi realizada pelo teste-t. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas com $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados em tabelas e gráficos, constando as médias e os desvios-padrão de cada parâmetro avaliado ao longo do tempo.

4.1 Frequência Cardíaca

A frequência cardíaca aumentou significativamente nos dois grupos que receberam a infusão de LPS. Observou-se uma diferença estatística no grupo LPS+AM no momento T90, e no grupo LPS+NaCl nos momentos T90 e T285. (Tabela1 e Figura 2).

4.2 Frequência Respiratória

Nos animais que receberam LPS, a frequência respiratória aumentou significativamente no momento T285. Porém no grupo LPS+AM este aumento começou no momento T90 até T285 (Tabela2 e Figura 3).

4.3 Temperatura retal

No grupo LPS+AM houve aumento significativo na TR a partir de T90. Porém, este aumento só foi estatisticamente significativo no momento T285 para o grupo LPS+NaCl (Tabela 3 e Figura 4).

4.4 Tempo de preenchimento capilar

O TPC apresentou aumento significativo no momento T90 no grupo LPS+AM (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 1 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	38 ^b	7	50 ^a	6	48 ^{ab}	8	50 ^{ab}	9
LPS+NaCl	39 ^b	3	57 ^a	13	48 ^a	5	47 ^{ab}	7
AM+NaCl	45	4	44	7	47	9	45	6

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença entre os momentos, no mesmo grupo ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

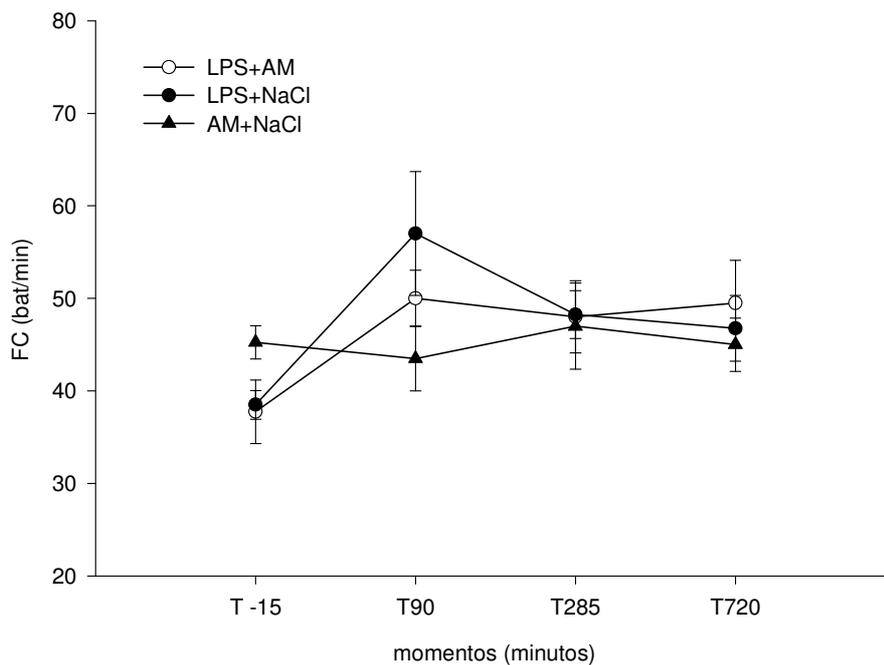


Figura 2 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da frequência cardíaca em batimentos por minuto de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 2 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da frequência Respiratória (FR) (movimentos por minuto) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	17 ^b	2,4	24 ^a	2,2	27,7 ^a	4,6	16,5 ^b	1,0
LPS+NaCl	20,5 ^b	2,1	17,75 ^b	3,6	38,75 ^a	12,5	14,75 ^b	3,9
AM+NaCl	28,5	7,2	29,75	5,7	25,75	6,6	23	1,2

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença entre os momentos, do mesmo grupo. ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

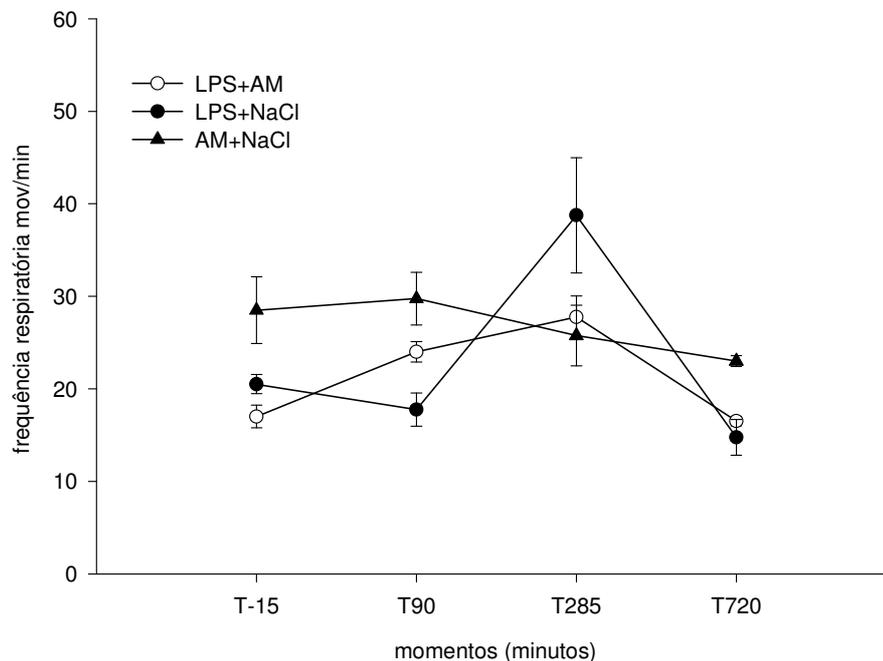


Figura 3 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da frequência respiratória em movimentos por minuto de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 3 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da temperatura retal (TR, °C) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	37,3 ^b	0,3	37,9 ^a	0,4	38,8 ^a	0,9	38,0 ^a	0,1
LPS+NaCl	37,6 ^b	0,3	38,3 ^{ab}	0,7	38,5 ^a	0,3	38,0 ^{ab}	0,2
AM+NaCl	38,6	0,4	38,5	0,3	38,4	0,2	38,5	0,1

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença entre os momentos, do mesmo grupo. ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls); [] desvio padrão.

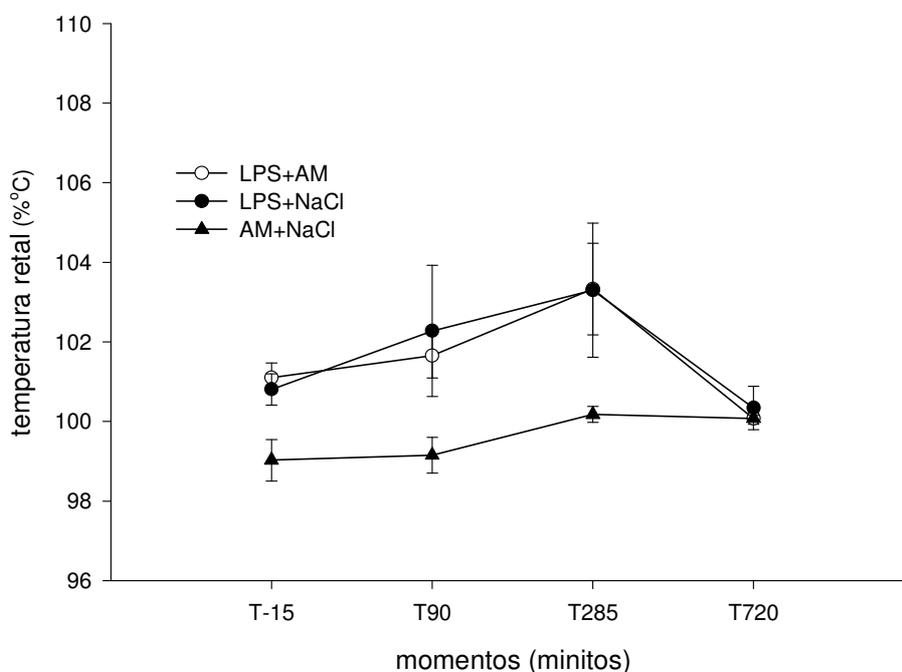


Figura 4 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da temperatura retal (TR, % °C) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 4 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) do TPC (segundos) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	2 ^b	0	3 ^{aA}	0,8	2 ^b	0	2,3 ^{ab}	0,5
LPS+NaCl	2	0	2,3	0,5	2,3	0,5	2,3	0,5
AM+NaCl	2	0	2 ^B	0	2	0	2	0

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença entre os momentos, do mesmo grupo. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si. ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

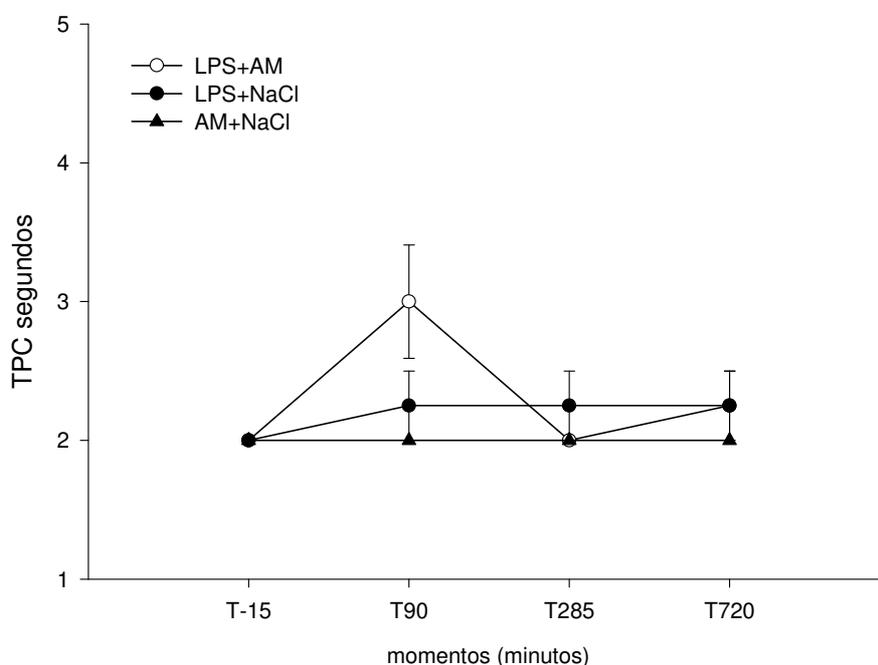


Figura 5 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão do TPC (segundos) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

4.5 Volume globular

Não houve diferença significativa para VG ao longo das 12 horas de observação (Tabela 5 e Figura 6).

4.6 Contagem de hemácias

Houve diferença significativa para a contagem de hemácias entre os grupos LPS+AM e AM+NaCl, no momento T285 (Tabela 8 e Figura 9)

4.7 Concentração de hemoglobina

Os resultados não apresentaram diferença significativa para concentração de hemoglobina no sangue ao longo das 12h (Tabela 10 e Figura 11).

4.8 Contagem de leucócitos

Os grupos que foram infundidos LPS, apresentaram redução na contagem de leucócitos no momento T90. No momento T720 houve aumento na contagem de leucócitos, nestes mesmos grupos. Porém esta variação não foi estatisticamente significativa. No momento T720 houve diferença significativa na contagem de leucócitos entre os grupos LPS+NaCl e AM+NaCl. (Tabela 9 e Figura 10).

Tabela 5 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) do volume globular (L/L) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	0,28	0,03	0,28	0,03	0,27	0,06	0,27	0,04
LPS+NaCl	0,32	0,05	0,31	0,04	0,31	0,05	0,30	0,04
AM+NaCl	0,34	0,07	0,35	0,06	0,36	0,06	0,36	0,06

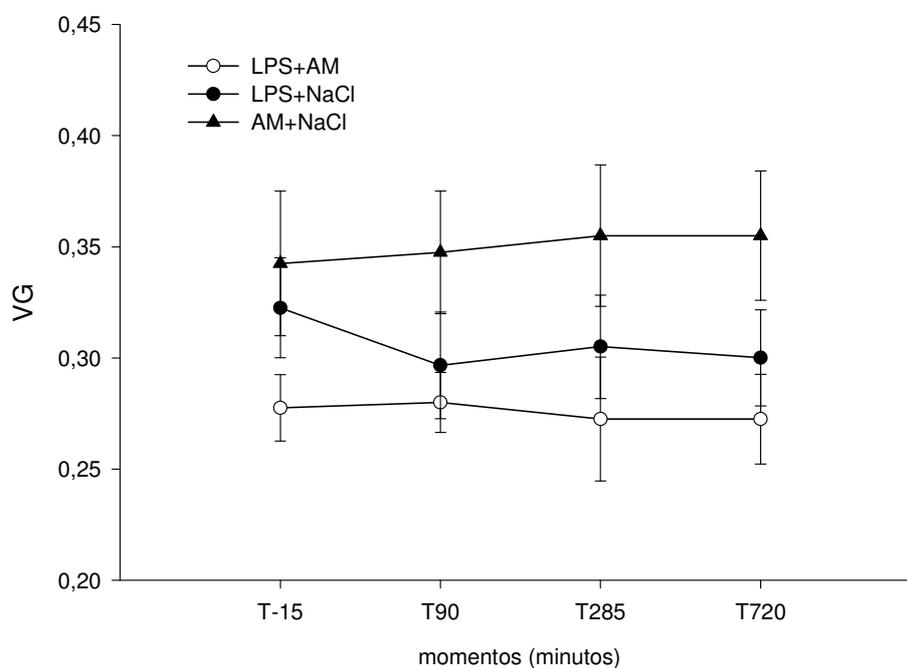


Figura 6 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão do VG (L/L) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 6 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da contagem de hemácias ($\times 10^{12}/L$) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	8,23	0,91	9,14	0,59	7,87 ^B	0,47	7,88	0,55
LPS+NaCl	8,65	0,53	8,73	0,14	9,11	0,63	8,60	0,97
AM+NaCl	10,25	0,85	9,64	0,82	10,20 ^A	2,97	8,46	0,87

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si. ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

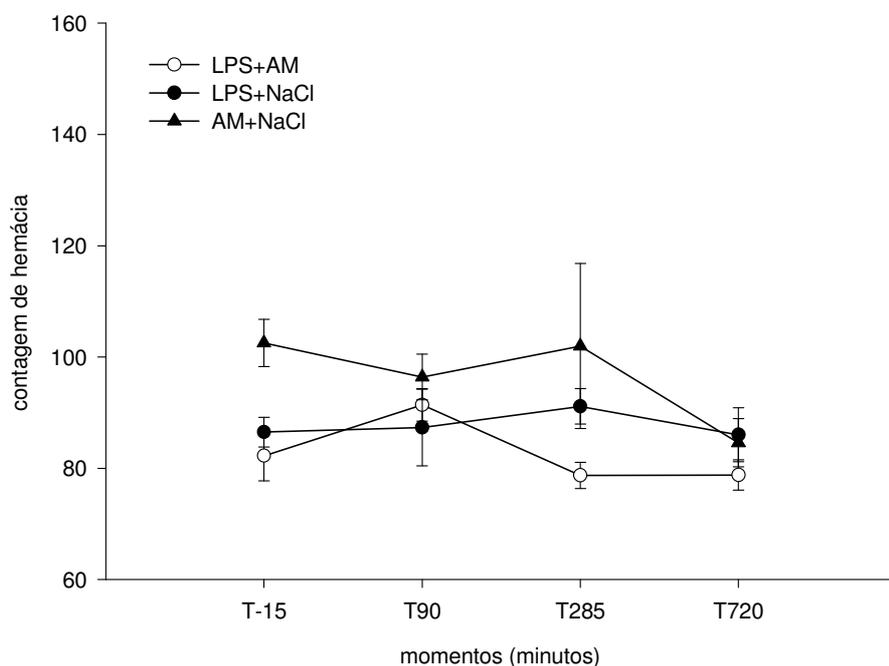


Figura 7 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da contagem de hemácias ($\times 10^{12}/L$) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 7 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da concentração de hemoglobina (Hb; g/L) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	105,7	12,7	112,9	12,7	105,8	16,3	108,5	19,0
LPS+NaCl	127,8	16,1	122,3	6,8	117,3	19,6	114,6	16,9
AM+NaCl	107,0	10,1	109,5	8,6	113,3	14,2	114,0	14,5

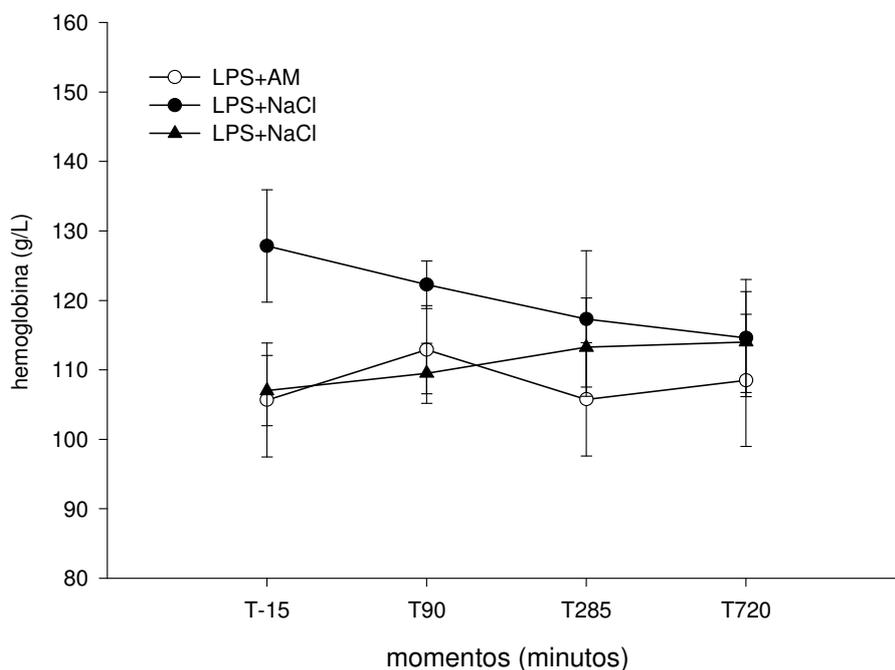


Figura 8 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da concentração de hemoglobina (g/L) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 8 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da contagem de leucócitos ($\times 10^9/L$) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T90				T285			
	T-15		T90		T720		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	11,7	2,3	7,6	2,5	12,0	3,1	15,0	2,0
LPS+NaCl	11,4	1,8	5,1	1,0	12,1	2,7	18,1A	2,2
AM+NaCl	11,1	0,9	11,6	1,2	13,2	3,0	11,3B	0,5

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si. ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

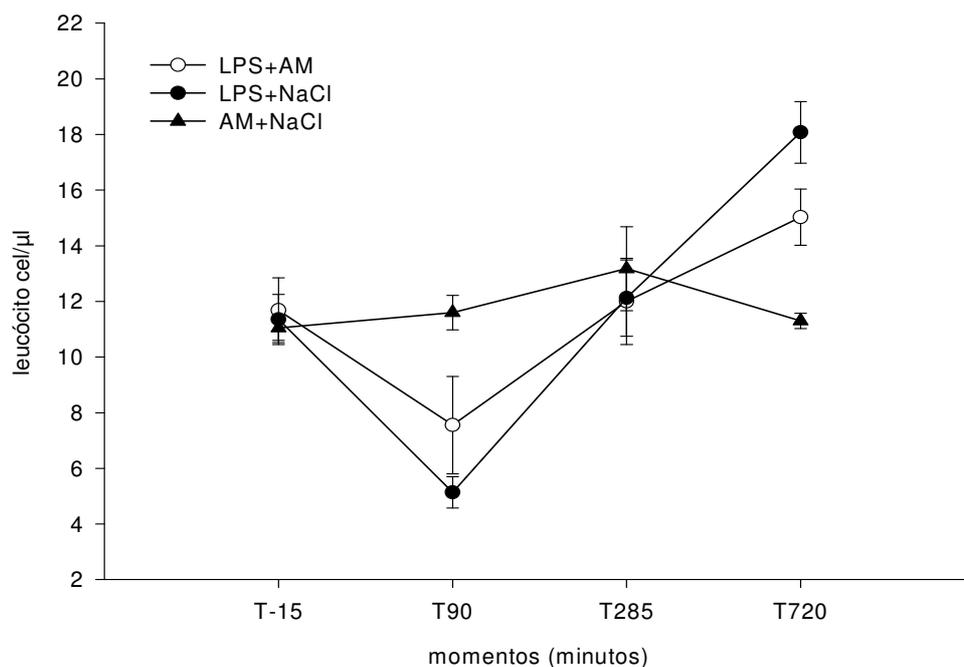


Figura 9 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da contagem de leucócitos ($\times 10^9/L$) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

4.9 Proteínas plasmáticas totais

Os valores de PPT reduziram a partir do momento T285 para ambos grupos que receberam LPS. O grupo AM+NaCl apresentou valores menores de PPT desde o momento T-15. (Tabela 6 e Figura 7).

4.10 Fibrinogênio

Houve aumento significativo de fibrinogênio nos momentos T285 e T720, no grupo LPS+AM. Entre os grupos LPS+AM e AM+NaCl houve diferença no momento T720 (Tabela 7 e Figura 8).

4.11 Concentração sérica de glicose

No momento T720 houve redução significativa na concentração sérica de glicose, no grupo AM+NaCl (Tabela 11 e Figura 12).

Tabela 9 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da concentração sérica da proteína total (PPT; g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T90				T285			
	T-15		T720		T720		T285	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	9 ^{aA}	0,1	9,1 ^{aA}	0,1	8,5 ^{bA}	0,3	8,8 ^{abA}	0,3
LPS+NaCl	9,1 ^{aA}	0,3	8,9 ^{abA}	0,2	8,7 ^{bA}	0,3	8,7 ^{bA}	0,1
AM+NaCl	6,2 ^B	0,3	6,2 ^B	0,1	6,2 ^B	0,2	6,2 ^B	0,4

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença entre os momentos, do mesmo grupo. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si. ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

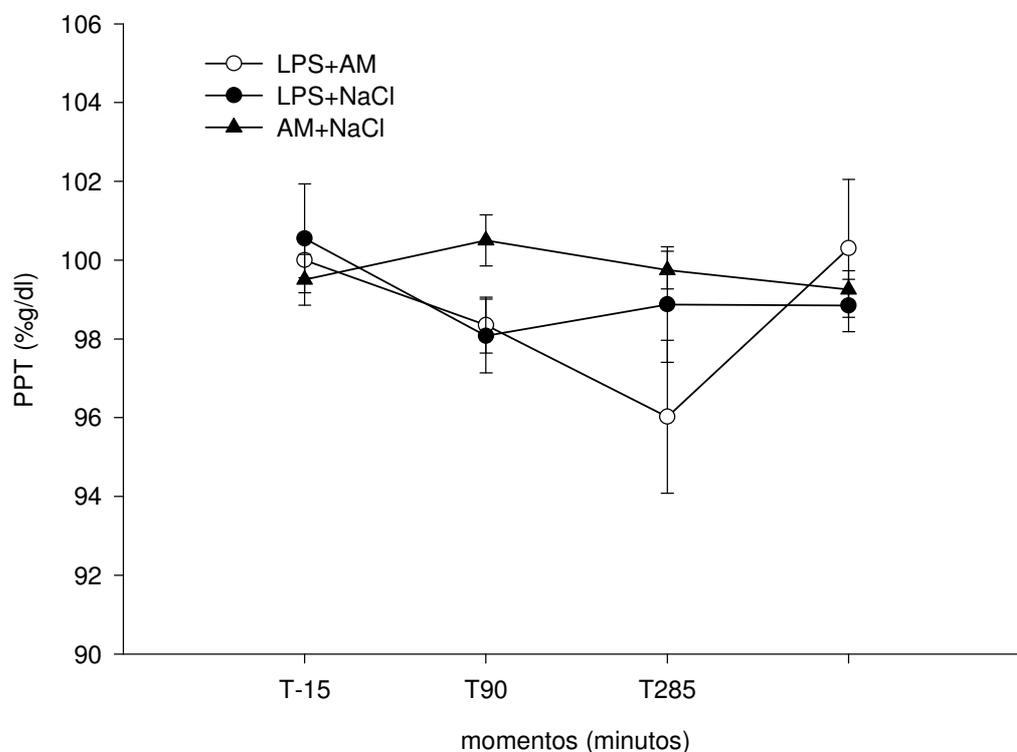


Figura 10 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da PPT (%g/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 10 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da concentração de fibrinogênio (g/L) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T90				T285			
	T-15		T720		T720		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	0,2 ^b	0,1	0,4 ^{ab}	0,2	0,4 ^a	0,1	0,5 ^{bB}	0,2
LPS+NaCl	0,2	0,1	0,3	0,1	0,4	0,2	0,3	0,1
AM+NaCl	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2 ^A	0,1

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença entre os momentos, do mesmo grupo. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si. ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls); [] desvio padrão.

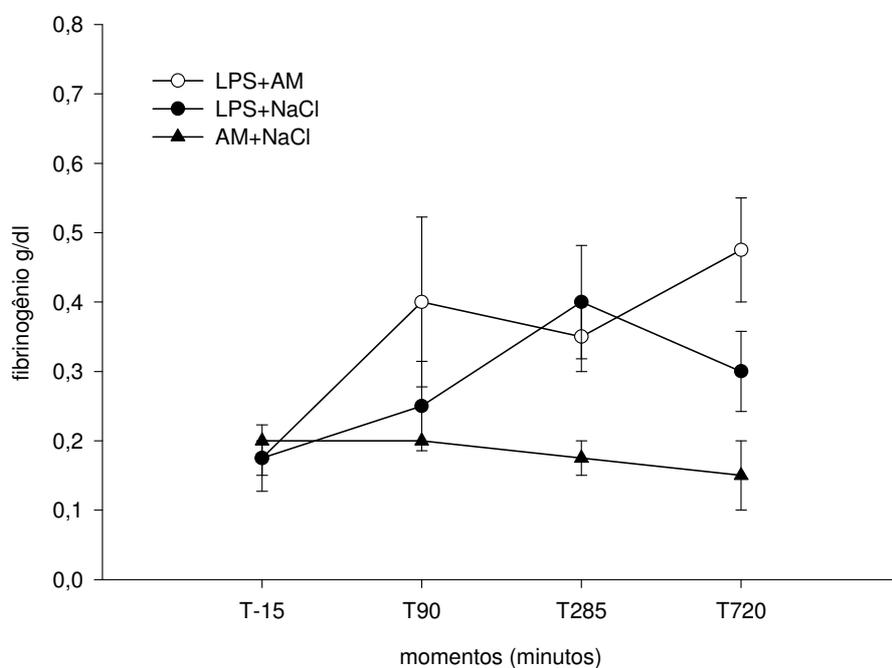


Figura 11 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão do fibrinogênio (g/L) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 11 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da concentração sérica de glicose (mg/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	82,3	9,1	91,4	5,9	78,7	4,7	78,8	5,5
LPS+NaCl	86,5	5,3	87,3	13,8	91,1	6,3	86,0	9,7
AM+NaCl	102,5 ^a	8,5	96,4	8,2	102,0	29,7	84,6 ^b	8,7

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença entre os momentos, do mesmo grupo. ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

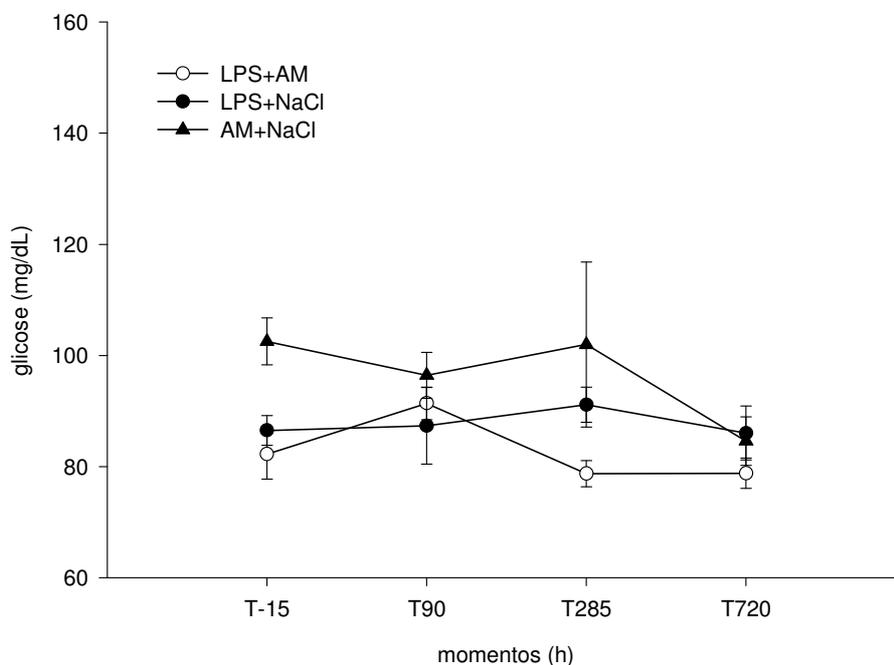


Figura 12 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da concentração sérica de glicose (mg/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

4.12 Imuno Globulina A (Ig A)

Os resultados não apresentaram diferença significativa para Ig A ao longo das 12 horas de observação (Tabela 13 e Figura 14).

4.13 Transferrina

Houve diferença significativa para a concentração de transferrina entre os momentos T-15 e T285 no grupo LPS+AM, e entre os grupos LPS+NaCl e AM+NaCl nos momentos T-15 e T90 (Tabela 14 e Figura 15).

4.14 Albumina

Houve diferença significativa para a concentração de albumina entre o grupo AM+NaCl, quando comparado com os grupos LPS+NaCl e LPS+AM, em todos os momentos avaliados (Tabela 15 e Figura 16).

4.15 Imuno globulina G de cadeia longa (IgG de cadeia longa)

Os resultados não apresentaram diferença significativa para IgG de cadeia longa ao longo das 12 horas de observação (Tabela 16 e Figura 17).

Tabela 12 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da Ig A (g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	0,15	0,04	0,23	0,07	0,24	0,04	0,19	0,09
LPS+NaCl	0,21	0,05	0,23	0,07	0,16	0,12	0,19	0,05
AM+NaCl	0,18	0,03	0,19	0,03	0,17	0,04	0,19	0,03

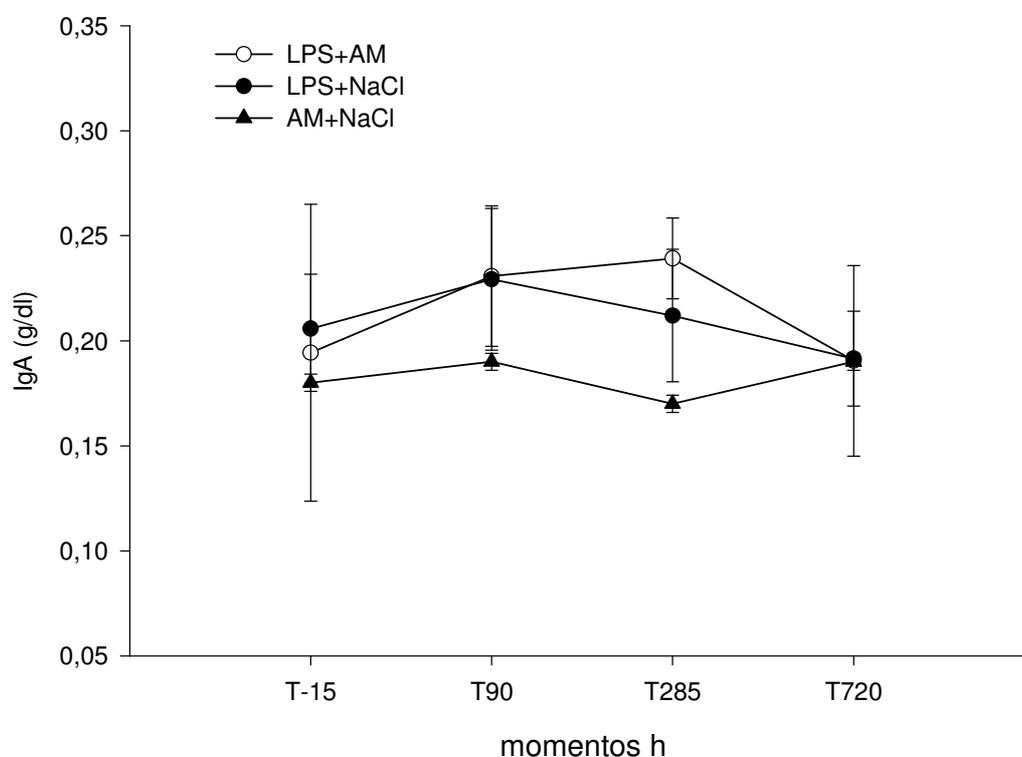


Figura 13 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da Ig A (g/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 13 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da transferrina (g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	0,54 ^{aa}	0,08	0,51 ^A	0,06	0,38 ^b	0,06	0,45	0,07
LPS+NaCl	0,39	0,06	0,43	0,02	0,40	0,02	0,45	0,02
AM+NaCl	0,27 ^B	0,01	0,28 ^B	0,01	0,29	0,02	0,28	0,01

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença entre os momentos, do mesmo grupo ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

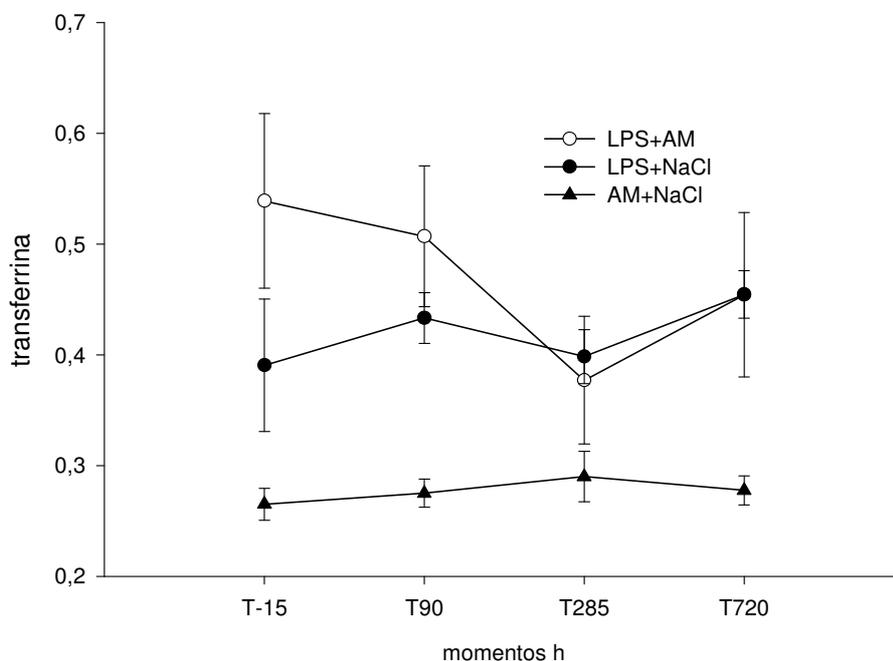


Figura 14 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da transferrina (g/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 14 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da albumina (g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	4,4890 ^A	0,2360	4,3051 ^A	0,1081	3,8780 ^A	0,1622	4,4675 ^A	0,1058
LPS+NaCl	4,6696 ^A	0,3572	4,3513 ^A	0,3157	3,0233 ^A	2,0391	4,2197 ^A	0,3427
AM+NaCl	2,4566 ^B	0,2822	2,4892 ^B	0,2884	2,6031 ^B	0,1872	2,5104 ^B	0,3475

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si. ($p \leq 0,05$ teste-t, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

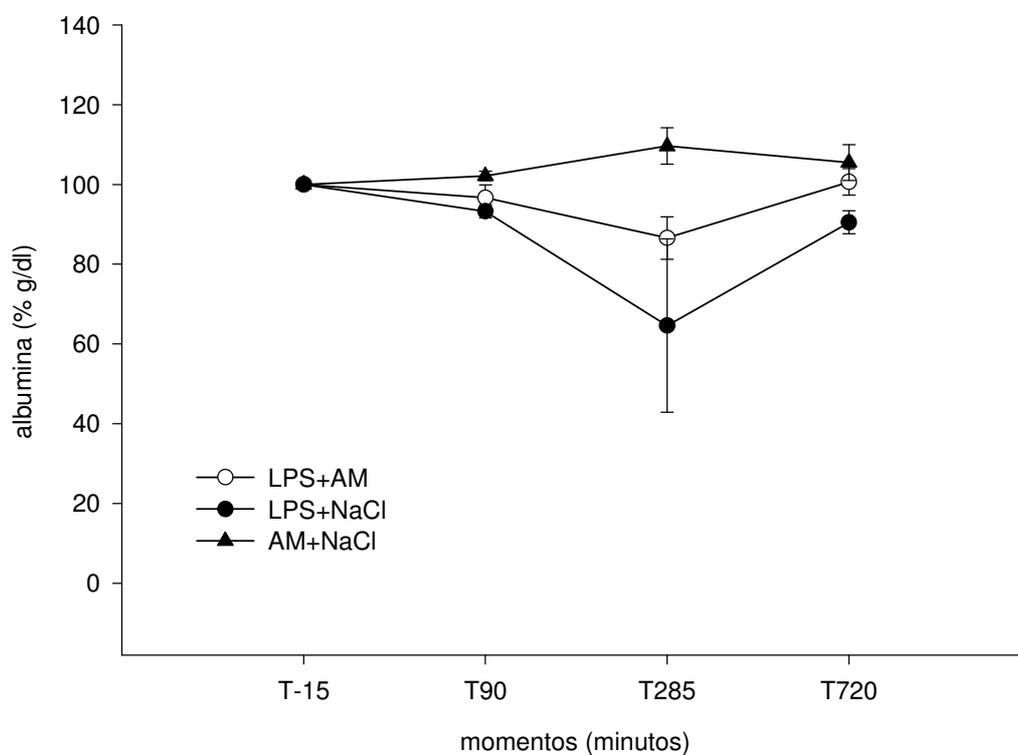


Figura 15 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da albumina (%g/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 15 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da IgG de cadeia longa (g/dL) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	1,03	0,35	1,30	0,13	1,32	0,16	1,03	0,18
LPS+NaCl	1,09	0,16	1,26	0,18	1,40	0,18	1,11	0,16
AM+NaCl	1,14	0,09	1,17	0,04	1,04	0,25	1,13	0,10

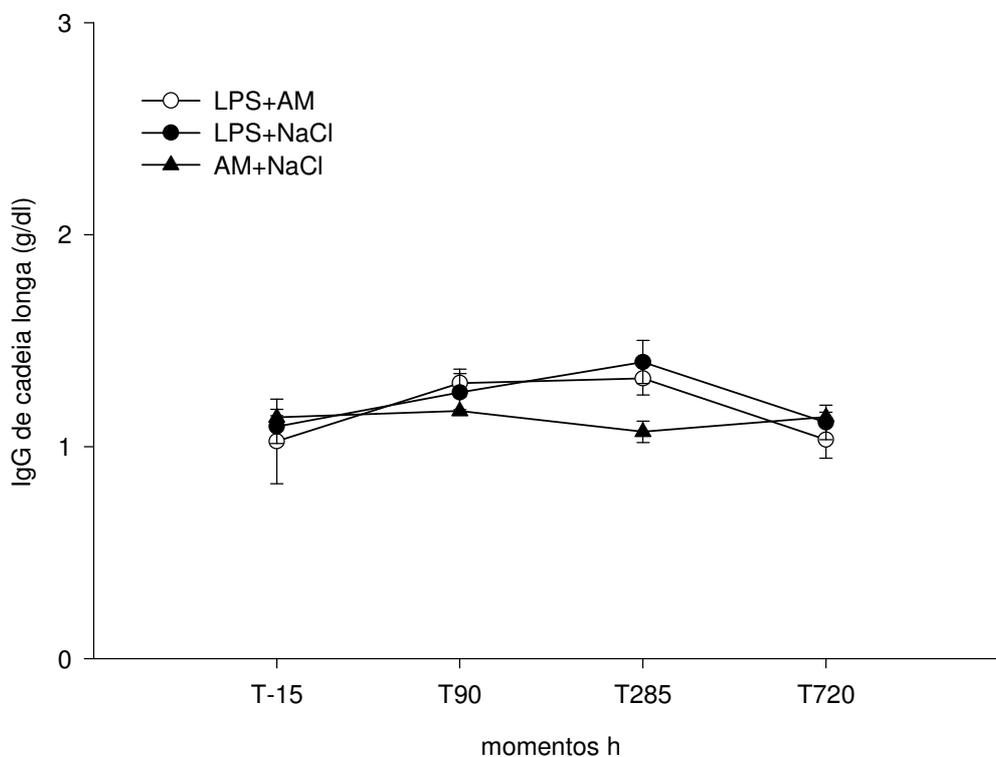


Figura 16 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da IgG de cadeia longa (g/dL) em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

4.16 Óxido nítrico

Os resultados não apresentaram diferença significativa para óxido nítrico (NO) plasmático ao longo das 12 horas de observação (Tabela 12 e Figura 13).

4.17 Atividade Sérica da Interleucina 6 (IL-6)

Os resultados não apresentaram diferença significativa para atividade sérica da Interleucina (IL-6) ao longo das 12 horas de observação (Tabela 17 e Figura 18).

4.18 Atividade sérica do Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)

Os resultados não apresentaram diferença significativa para atividade sérica do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) ao longo das 12 horas de observação (Tabela 18 e Figura 19).

Tabela 16 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) do Óxido Nítrico (NO) de equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	59,3	29,0	60,3	29,0	61,3	29,0	66,3	29,0
LPS+NaCl	60,8	37,6	61,8	37,6	62,8	37,6	66,3	37,4
AM+NaCl	45,4	21,6	46,0	28,1	42,5	38,5	19,3	6,2

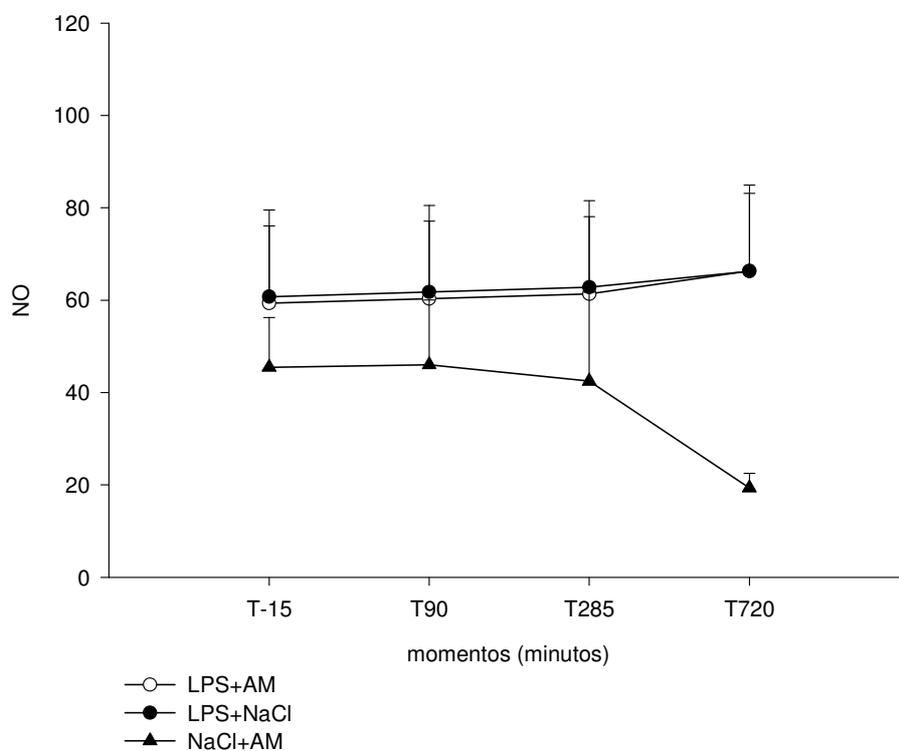


Figura 17 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão do óxido nítrico em equinos dos grupos LPS+AM, LPS+NaCl e AM+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 17 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da atividade sérica da interleucina 6 (IL-6) de equinos dos grupos LPS+AM e LPS+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285		T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	24,1	18,3	9,0	10,3	8,1	11,9	22,5	27,8
LPS+NaCl	6,6	8,2	4,1	7,7	3,2	3,7	10,9	5,7

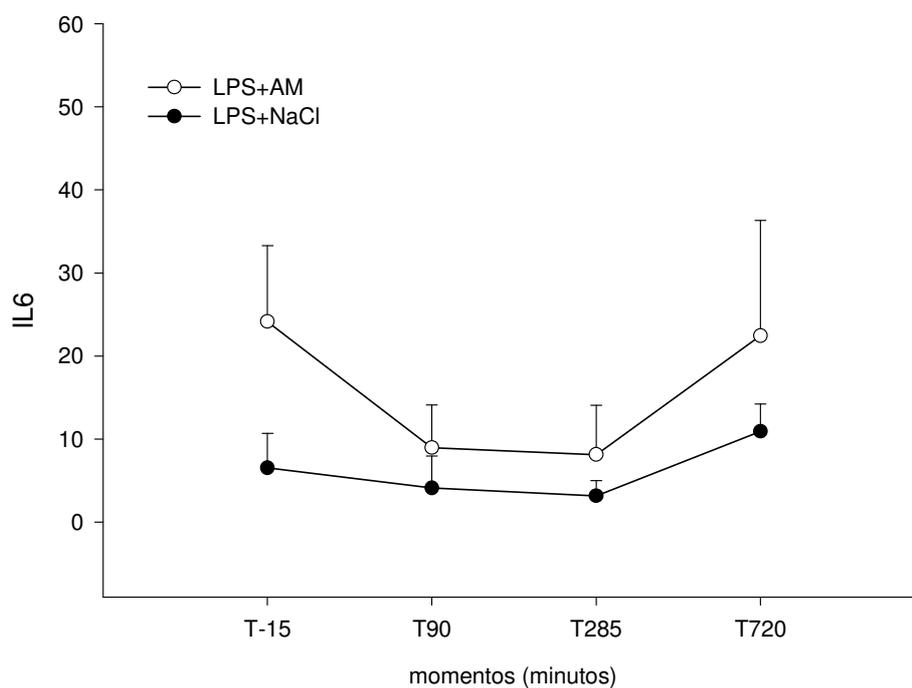


Figura 18 — Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da atividade sérica da IL-6 em equinos dos grupos LPS+AM e LPS+NaCl, ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tabela 18 - Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (s) da atividade sérica do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) de equinos dos grupos LPS+AM e LPS+NaCl ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

Tempo	T-15		T90		T285 T720		T285 T720	
	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)	\bar{x}	(s)
LPS+AM	24,4	18,5	10,8	10,9	15,4	15,0	9,0	8,9
LPS+NaCl	13,4	7,4	10,1	2,8	12,6	5,7	10,3	3,0

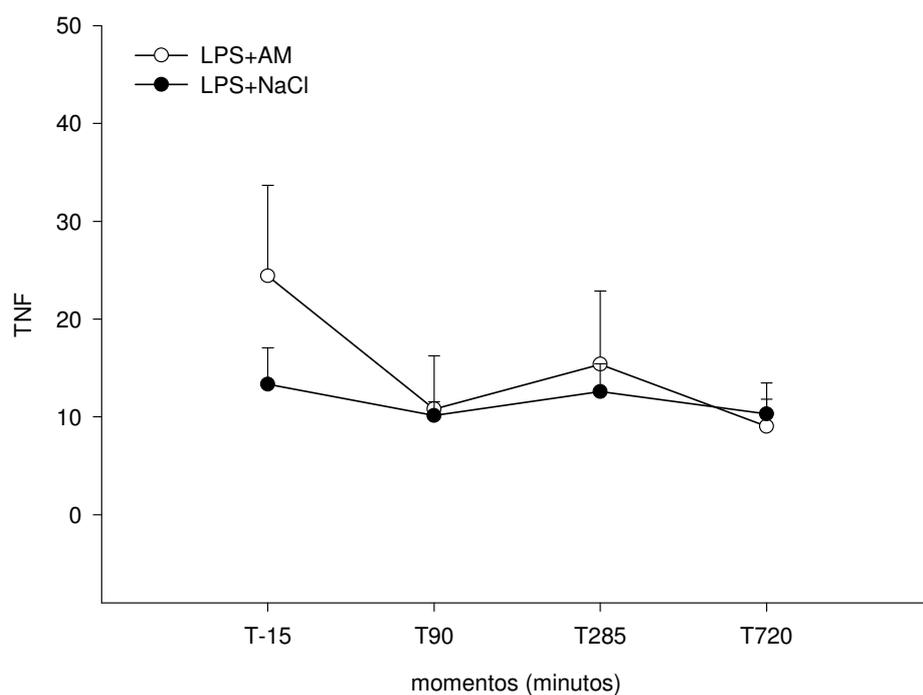


Figura 19 – Representação gráfica das variações das médias e desvios padrão da atividade sérica do TNF- α de equinos dos grupos LPS+AM e LPS+NaCl, ao longo de 12 horas após a indução da endotoxemia.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que o intervalo de três horas seria suficiente para observar sinais de endotoxemia, uma vez que os níveis máximos de TNF alfa ocorrem nesse período (MORRIS, 1991). Entretanto optou-se por 12 horas de observação, com o intuito de melhor acompanhamento das respostas das IL-1 e IL-6 (KISHIMOTO, 1992) e também para acompanhar um possível efeito do AM na curva de produção de óxido nítrico.

Decorridos 60 minutos da aplicação de LPS, todos os animais apresentaram-se deprimidos e inapetentes. Sabe-se que a depressão, inquietação e inapetência constituem sinais que se manifestam gradualmente, fato também observado em outros estudos (HENRY & MOORE, 1990; MacKAY, 1992; COLLATOS, 1995).

O primeiro dos corantes empregados como antisséptico urinário foi o azul de metileno (AM), ou do cloreto de tetrametilitionina, que pode ser reduzido a formas incolores ou leucobase (leucometileno) devido a sua característica reversível de oxidação-redução. Possui dois efeitos interessantes e opostos sobre a hemoglobina, sendo um deles, empregado em doses altas, converte o radical ferroso da hemoglobina reduzida à forma férrica e, em consequência, pode produzir meta-hemoglobina. O efeito inverso é observado quando ele é empregado em doses baixas, elevando moderadamente a pressão arterial, por vasoconstrição periférica, induzindo aumento do débito cardíaco (GOODMAN & GILMAN, 1970). KENNEDY et al. (2000) recomendaram o AM em solução a 2% para tratar a metahemoglobinemia uma vez que em sua forma leucometileno ele reduz a metahemoglobina em hemoglobina. A dose de AM

empregada neste estudo foi maior do que a descrita por BLOOD & HENDERSON (1978) como tratamento específico para a intoxicação por nitrato e nitrito que recomendam a administração em solução a 1% a exemplo da concentração aqui empregada, sendo inclusive reaplicada nos quadro de intoxicação mais severa.

Optou-se pela dose de 3 mg/kg de AM, pois a mesma dose, na forma de bolus, foi empregada para tratamento de pancreatite necrotizante aguda em suíno, (MEIRELLES et al., 2008) e por URIBE et al. (2008) em modelo de isquemia intestinal de equinos.

O delineamento experimental consistiu na administração terapêutica de AM por infusão contínua empregando a dose utilizada por ZHANG et al. (1995) e MEIRELLES et al. (2008) que segundo estudo de OZAL et al. (2005) o AM apresenta efeitos benéficos mesmo quando empregado em dose única, na forma de bolus, imediatamente antes da cirurgia, por manter a resistência vascular sistêmica em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca.

O AM atrasa o desenvolvimento do choque hipovolêmico e diminui as concentrações plasmáticas de nitrato (MEIRELLES et al., 2008), por diminuir a síntese de NO (THIEMERMAN, 1993). Sabe-se que no choque endotoxêmico por LPS em equinos ocorre inicialmente uma fase hiperdinâmica mediada pela liberação de tromboxano e posteriormente, há predominância do componente vascular hipodinâmico caracterizado por diminuição volêmica por vasoplegia e perda de fluido para a cavidade abdominal que pode estar relacionado à liberação mórbida de NO que atua reduzindo a resistência vascular sistêmica (TODA, 1981). Por inibir a guanilato ciclase solúvel e, portanto da geração de cGMP, o AM tem sido empregado em modelos de choque distributivos

causados por sepse e em caso clínicos de reações anafiláticas desencadeadas por liberação de histamina (PREISER et al., 1995; EVORA et al., 2002; KWOK & HOWES, 2006), pois em doses de 2,5 a 10 mg/kg são capazes de elevar a pressão arterial média (PAM) (ZHANG et al., 1995).

Observou-se aumento da frequência cardíaca 90 minutos após a administração de LPS, em ambos grupos que foram tratados com LPS, fato também observado por CAMPEBELL et al. (2007) e MOORE (1990), pois a fase hiperdinâmica do choque endotoxêmico caracteriza-se por taquicardia com aumento do débito cardíaco e aumento na resistência vascular periférica (PARRILLO et al., 1990). URIBE et al. (2008) estudando a ação do azul de metileno em equinos submetidos a obstrução intestinal, também relataram aumento significativo na frequência cardíaca após administração de LPS, provavelmente devido a fase hiperdinâmica supracitada. Trinta minutos após a administração de LPS a concentração de tromboxano no plasma aumenta, este metabólito do ácido araquidônico desencadeia taquipnéia e taquicardia, sendo o principal responsável pela fase compensatória do choque endotoxêmico (BOTTONS et al., 1982). EVORA (2009) estudando a ação do AM em equinos hípidos observou aumento na frequência cardíaca cinco minutos após a infusão do AM, fato que pode ter contribuído para o aumento da frequência cardíaca no presente estudo.

O NO é o principal mediador envolvido na vasodilatação neurogênica que ocorre na vasculatura pulmonar (LIU et al., 1993). GUMUSEL et al. (2001) também descreveram a ação do NO no relaxamento de artérias pulmonares em ratos. Na presença do AM a vasodilatação neurogênica é bloqueada, pois este inibe a guanilato ciclase solúvel, bloqueando assim o GMPc. A

administração intravenosa de AM em cães provocou aumento no tônus vascular pulmonar, mesmo em condições de hipóxia (LEEMAN et al., 1994). A produção endógena de NO possui papel importante na redução da resistência da circulação pulmonar (FINEMAN et al., 1991). A ausência do NO promove vasoconstrição pulmonar, que leva ao aumento na pressão arterial pulmonar, dificulta a circulação sanguínea e conseqüentemente a absorção de Oxigênio. Estes fatos explicam o maior aumento da frequência respiratória nos animais do grupo LPS+AM no momento 90 minutos, quando comparado com os outros grupos. Deve-se ressaltar que equinos endotoxêmicos apresentam taquipnéia (CAMPEBELL et al., 2007; MOORE, 2001) fato que pode ter contribuído para o aumento desta variável.

A febre é uma resposta inflamatória sistêmica (KLUGER, et al., 1995), que pode ser causada por estímulos patogênicos, tais como a endotoxina, que estimula células imunes periféricas a sintetizar mediadores inflamatórios. Entre esses mediadores pode-se destacar a IL-1, pois esta tem sido referida como a citocina de maior ação pirogênica, por induzir a síntese de prostaglandina E que age diretamente no sistema nervoso central (KLUGER 1991), o TNF- α que também promove aumento na temperatura corpórea (ROSA et al., 2003), a IL-6 também mostrou ter grande correlação com as mudanças de temperatura corpórea (CARTMELL et al., 2000). Porém no presente estudo, mesmo apresentando aumento significativo nos grupos que receberam LPS, a temperatura retal não excedeu os valores de referência citados por SPEIRS (1997).

Segundo MOORE et al. (1995), o tempo de preenchimento capilar (TPC) é um ótimo indicador da perfusão sanguínea periférica nos quadros de

abdômen agudo, pois o TPC acima dos valores fisiológicos indicam que a circulação periférica encontra-se comprometida, está ocorrendo severa hipoperfusão e desencadeando o choque. Esses relatos corroboram e justificam os achados neste estudo em relação ao TPC.

Analisando os resultados do eritograma não observou-se diferença significativa para os valores de volume globular e concentração de hemoglobina. Para contagem de hemácias houve aumento, embora não fosse significativo, após a administração do AM nos grupos tratados com LPS, sugerindo contração esplênica, diferentemente dos achados relatados por MUIR & HUBELL (1991) e COSTA (2003). A contagem de proteína total apresentou redução após a administração do LPS em ambos grupos. Esta redução deve-se a saída de proteína do espaço intra para o extravascular (DAVIES & HAGEN, 1997), devido à permeabilidade de macromoléculas nos capilares, levando ao extravasamento de proteínas (HINSHAW, 1996). Destaca-se também a importância do aumento dos poros, como agente facilitador deste processo (RIPPE & HARALDSSON, 1994), além de possíveis alterações hormonais causadas pelo estresse (LATIMER et al., 2003)

A contagem total dos leucócitos, no sangue, evidenciou diminuição nos animais dos dois grupos experimentais que receberam LPS, no momento 90 minutos, retornando gradativamente aos níveis basais, sendo que no final do período experimental, a contagem revelou aumento nos níveis de leucócitos. Deve-se ressaltar que esta variação não apresentou diferença estatística, mas a dinâmica da contagem de leucócitos ocorreu como o descrito por vários autores (CARGILE et al., 1995; DURANDO et al., 1994). Os efeitos da endotoxemia na celularidade sanguínea geralmente incluem um quadro de

leucopenia, devido à rápida marginação de neutrófilos (HENRY & MOORE, 1990; DURANDO et al., 1994). O óxido nítrico presente na circulação impede a aderência do neutrófilo ao endotélio, dificultando sua migração para o espaço extra vascular (HORNG-CHYUAN et al., 2003). RIBEIRO et al. (2004) estudando o efeito do AM na resposta hemodinâmica de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização, observou que o grupo tratado com AM apresentou contagem menor para leucócitos, quando comparado com o grupo não tratado, fato que pode ser explicado pela menor quantidade de NO circulante no grupo tratado.

A concentração plasmática de glicose depende de uma ampla variedade de fatores e resulta do equilíbrio entre a quantidade de açúcares que entra e aquela que é removida da circulação (RALSTON, 2002). Neste estudo, observou-se redução na concentração de glicose no sangue dos animais dos três grupos no final do período experimental, contudo, só houve diferenças significativas com relação à taxa de glicose plasmática no último período experimental, para o grupo NaCl+AM, provavelmente em decorrência do jejum durante o período experimental.

O óxido nítrico emergiu como uma molécula reguladora intracelular e intercelular importante, com funções variadas como a vasodilatação, a comunicação neural ou defesa do hospedeiro (PARK et al., 1997). Sabe-se que a produção de TNF- α é crucial para a indução da síntese de NO por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS (GREEN et al., 1990; JUN et al., 1995). (ISHIDA et al., 2000) estudando Células de equino estimuladas com LPS e citocinas, sugeriram que a produção de NO pode ser dependente dos níveis de LPS. Devido ao seu papel pivô nas atividades

antimicrobiana e tumoricida de macrófagos murinos, um grande esforço tem sido feito para o desenvolvimento de agentes terapêuticos que regulem a produção ou a ação do NO (PARK et al., 1997).

A ausência de diferenças significativas, entre animais dos três grupos, com relação à concentração de óxido nítrico pode ser interpretada sob duas perspectivas. Ou não houve diferença entre os grupos em decorrência do uso do azul de metileno, ou o método utilizado não foi eficiente para detectá-las. Foram observadas tendências similares dos valores no sangue de todos os animais. MIRZA et al. (2005) e COSTA et al. (2003) relataram que, são desconhecidos os motivos pelos quais não se tem encontrado diferenças significativas nos níveis de NO no plasma, líquido peritoneal e urina de cavalos acometidos por algum tipo de distúrbio do trato gastrointestinal espontâneo ou experimental. Provavelmente, neste ensaio o efeito inibitório do azul de metileno sobre o NO foi marcante, principalmente no grupo AM+NaCl que apresentou redução nos valores no momento 720.

Muitos estudos experimentais destacam a importância da IL-1 e IL-6 como mediadores endógenos da resposta febril. Essas citocinas estão envolvidas na estimulação da síntese de proteína de fase aguda, na ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), no início da cascata do ácido araquidônico, assim como na indução da síntese de outras citocinas (KLUGER et al., 1995; SPANGELO & GAROSPE, 1995; BLATTEIS & SEHIC, 1997; DINARELLO, 1997). As proteínas de fase aguda positivas, fibrinogênio, glicoproteína ácida e haptoglobulina (TAKAGUCHI et al., 1990; TRUMEL et al., 1996), se elevam imediatamente após a instalação do processo inflamatório e ou endotóxico (GODSON et al., 1996), decrescendo rapidamente com a

regressão da lesão (KENT, 1992). As concentrações séricas das proteínas de fase aguda negativa tendem a decrescer na presença de condições inflamatórias, tendo como principais representantes a albumina e a transferrina (KANEKO et al., 1997).

Ambos grupos que receberam LPS tiveram a concentração de fibrinogênio aumentada, porém só apresentou diferença estatística o grupo LPS+AM. A elevação do teor de fibrinogênio, proteína de fase aguda, segundo FAGLIARI & SILVA (2002), indica a existência de uma resposta inflamatória. Já as concentrações de IgA não apresentaram variações significativa. As concentrações de transferrina e albumina e a IgG apresentaram queda em relação ao momento basal, nos grupos LPS+AM e LPS+NaCl, caracterizando uma resposta inflamatória (KANEKO et al., 1997).

O TNF- α tem sido considerado um mediador primordial no início das respostas biológicas às endotoxinas (MORRIS et al., 1991; TRACEY et al., 1992; MOORE et al., 1995). Muitos resultados experimentais sustentam esta hipótese, uma vez que níveis altos de TNF- α foram detectados no plasma de animais e humanos após a administração de LPS (BEUTLER et al., 1985; MATHISON et al., 1988). Além do mais, a infusão de TNF em ratos, camundongos e cães causou mudanças fisiopatológicas similares às aquelas produzidas após a infusão de LPS (TRACEY et al., 1986; REMICK et al., 1987). E, finalmente, a imunização passiva de camundongos e chimpanzés com anti-TNF- α conferiu proteção contra os efeitos letais da endotoxina e *E. coli* intravascular (BEUTLER et al., 1985).

A maioria das manifestações da endotoxemia tem sido creditada à ação de vários mediadores liberados pelas células do hospedeiro. As citocinas pró-

inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e interferon- γ (INF- γ) possuem papel fundamental nas respostas inflamatórias (HACK et al., 1997). Adicionalmente à variedade de atividades biológicas creditadas ao TNF- α , a indução de outras citocinas e eicosanóides tem um papel importante uma vez que, na cascata inflamatória, a liberação de TNF- α ocorre primeiramente, seguida da liberação de IL-1 β e finalmente IL-6 (BLATTEIS, 1998). Essa sequência, bastante característica do aparecimento das diferentes citocinas inflamatórias no sangue circulante, denominada cascata citocínica, é determinada pela capacidade de uma citocina induzir a produção de outra. Parece que tanto o TNF- α quanto a IL-1 β são capazes de induzir a liberação de IL-6, estimulando monócitos/macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, linfócitos T e mastócitos a produzir e secretar (KISHIMOTO, 1989). No presente estudo não foi observado variação na atividade de da IL6 e TNF, provavelmente pelo N reduzido.

6 CONCLUSÕES

Avaliando-se os efeitos clínico, celular e bioquímico da infusão de AM em equinos pré-tratados com LPS, conclui-se que:

1. A dose de 3mg/kg de AM a 1%, infundida por quinze minutos não se mostrou tóxica aos equinos.
2. Não foi possível afirmar o efeito benéfico da administração do azul de metileno sobre a resposta dos equinos submetidos a esse modelo de endotoxemia experimental.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTIZ, M.E. et al. Pretreatment of normal humans with monophosphoryl lipid A induces tolerance to endotoxin: A prospective, double-blind, randomized, controlled trial. **Crit. Care Med.**, Baltimore, v.23, p.9-17, 1995.

BAYSTON, K.F., COHEN, J. Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxemia. **J. Med. Microbiol.**, v.3, p.73-83, 1990.

BEUTLER, B.A.; MILSARK, I.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor production and metabolic fate in vivo. **J. Immunol.**, v.135, p.3972-3977, 1985.

BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E. Fever: How many circulating pyrogens signal the brain? **News Physiology Sciences**, v.12, p.1-9, 1997.

BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E.; LI, S. Afferent Pathway of Pyrogen Signaling. **Annals New York Academy Sciences**, v.856, p.95-107, 1998.

BLOOD, D. C., HENDERSON, J. A., **Medicina Veterinária**, Guanabara Koogan, 4ª Edição, Rio de Janeiro, p. 720-723, 1978.

BOTTOMS, G.D.; TEMPLETON, C.B. FESSLER, J.F.. et al Thromboxane, prostaglandin I₂, and the hemodynamic changes in equine endotoxin shock. **J. Vet. Res.** v. 43 p. 999-1002, 1982.

BRODGEN, K. A., PHILLIPS, M. The ultrastructural morphology of endotoxins and lipopolysaccharides. **Electron Microsc. Rev.**, v.1, p.261-277, 1988.

BURROWS, G.E. Endotoxemia in the horse. **Equine Vet. J.**, v.13, n.2, p.89-94, 1981.

CAMPEBELL, R.C. **Endotoxemia por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, em equinos: efeitos antiinflamatórios nas concentrações séricas e peritoneal do fator de necrose tumoral (TNF- α).** 71 f. Tese

(Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

CAMPEBELL, R.C.; PEIRÓ, J.R.; ROSA, P.C.S.; VALADÃO, C.A.A.; BECHARA, G.H., Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em equinos: efeito de antiinflamatórios nas concentrações séricas e peritoneal do tator de necrose tumoral alfa (TNF- α). **Arq. Brás. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.4, p.837-843, 2007.

CARGILE, J.L. et al. Effect of treatment with a monoclonal antibody against equine tumor necrosis factor (TNF) on clinical, hematologic and circulating TNF responses of miniature horse given endotoxin. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.56, n.11, p.1451-1459, 1995.

CARTMELL, T. et al. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. **Journal of Physiology**, v.526, n.3, p.653-661, 2000.

COLLATOS, C. Clinical conditions associated with endotoxemia. In: ANNUAL AAEP CONVENTION, Lexington, 1995. Proceedings. Lexington: **American Association of Equine Practitioners**, p.103-106, 1995.

COSTA, M.T.; FABENI, R.C.; APTEKMANN, K.P.; MACHADO, R.Z. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase em neoplasias. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.967-974, set-out, 2003.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutura e funcional de robbins** Ed. Guanabara koogan Rio de Janeiro, RJ, 6^o ed, 2000.

CRISTOL, J.P.; THIEMERMANN, C.; MITCHELL, J.A.; WALDER, C.; VANE, J.R. Support of renal blood flow after ischaemic reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites. **Br. J. Pharmacol.** V.109, p. 188-194, 1993.

DAVIES, M.G.; HAGEN, P.O. Systemic inflammatory response syndrome. **Br J Surg.** V. 84 P.920-935, 1997.

DINARELLO, C.A. Cytokine as endogenous pyrogens. In: Fever: Basis Mechanisms and Management. 2 ed, Ed. P.A. **Mackowiak**, Ed., p.87-116. Lippincott-Raven. Philadelphia, 1997.

DUCKLES, S.P.; LEE, T.J.F.; BEVAN, J.A. Cerebral arterial responses to nerve stimulation in vitro. Species variation in the constrictor and dilator components, in Neurogenic control of brain circulation. pergamon press, Oxford, p.133-141,1977.

DURANDO, M.M. Effects of polymyxin B and Salmonella typhimurium antiserum on horses given endotoxin intravenously. **Am. J. Vet. Res.**, v. 55, p. 921-927, 1994.

EVORA, J. trabalho de iniciação científica **CNPQ**, dados não publicados, 2009
EVORA, P. R., A. M. OLIVEIRA NETO, N. M. DUARTE, and W. V. VICENTE. Methylene blue as treatment for contrast medium-induced anaphylaxis. **J Postgrad Med** 48:327, 2002.

FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos e de equinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-567, 2002.

FEELISCH, M.; NOACK, E. The in vitro metabolism of nitrovasodilators and their conversion into vasoactive species in : **heart failure mechanisms and management**. P. 241-255, 1991.

FESSLER, J.F. et al. Plasma endotoxin concentrations in experimental and clinical equine subjects. **Equine Vet. J.**, Suppl.7, p.24-28, 1989.

FINEMAN, J. R.; HEYMANN M. A.; SOIFER, S. J., N omega-nitro-L-arginine attenuates endothelium-dependent pulmonary vasodilation in lambs **Am J Physiol Heart Circ Physiol** v. 260, p.1299-1306, 1991.

FONG, Y; LOWRY, S. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.55, p.157-70, 1990.

FREUDENBERG, N. et al. Distribution and localization of endotoxin in the rat during shock. **Pathol. Res. Prat.**, v.179, p.517-527, 1985.

GALVANI, A.L.S.; KREBS V.L.J.; VAZ, F.A.C. Características bioquímicas e propriedades dos mediadores humorais nas infecções bacterianas. **pediatria** v.21,p.123-132, 1999.

GODSON, D. L.; CAMPOS, M.; ATTAH-POKU, S.K.; REDMOND, M. J.; CORDEIRO, D. M.; SETHI,M. S.; HARLAND, R. J.; BABIUK, L. A. Serumhaptoglobulin as an indicator of the acute phaseresponse in bovine respiratory disease. **Veterinary Immunology**, v.51, p.277-292, 1996.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. [The Pharmacological Basis of Therapeutics](#) edit. Guanabara koogan; ed. 4, pag. 681-685; 1973.

GREEN, E.M.; ADAMS, R. New perspectives in circulatory shock: Pathophysiology mediators of the mammalian response to endotoxemia and sepsis. **JAVMA**, v.200, n.12, p.1834-1841, 1992.

GREEN, S.J. et al. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, v.145, n.12, p.4290-97, 1990.

GUMUSEL, B.; ORHAN, D.; TOLUNAY, O.; UMA, S. The role of nitric oxide in mediating nonadrenergic, noncholinergic relaxation in rat pulmonary artery. **Nitric oxide**, v.5 p. 296-301, 2001.

HACK, C.E. et al. Role of cytokines in sepsis. **Adv. Immunol.**, v.66, p.102-195, 1997.

HENRY, M.M., MOORE, J.N. Equine endotoxemia. In: SMITH, B.P. **Large animal internal medicine**, St. Louis: Mosby, p.619-835, 1990.

HIBBS, J.B.; VAVRIN, Z.; TAINTOR, R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. **J. Immunol** v.138,p.550-565, 1987.

HINSHAW, L.B. Sepsis/septic shock: Participation of the microcirculation: An abbreviated review. **Crit Care Med.** V.24 p. 1072-1078, 1996.

HORNG-CHYUAN, L. et al., effect of endogenous nitric oxide on hyperoxia and tumor necrosis factor- α -induced leukosequestration and proinflammatory cytokine release in rat airways, **crit. Care. med.** V.31 n.2, 2003.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl Acad. Sci.** v.84, p. 9265-9269, 1987.

ISHIDA, N. et al. NO production in cultured equine cells stimulated by LPS and cytokines. **J. Equine Science**, v.11, n.1, p.15-18, 2000.

JABLONS, D.M., et al. IL-6/IFN-beta-2 as a circulating hormone. Induction by cytokine administration in humans, **The Journal of Immunology**, v.142, n.5 1542-1547, 1989.

JUN, C.D. et al. Involvement of protein kinase C during taxol-induced activation of murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v.154, n.12, p.6541-47, 1995.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRISS, M. C. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed. San Diego: **Academic Press**, p.932, 1997.

KENNEDY, G.A.; OEHME, F.W. PICKERELL, J.A., Nitrate intoxication in cattle, **Vet. Quarterly**, v.3n.1p.1-2, 2000.

KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. **British Veterinary Journal**, v.148, p.279-282, 1992.

KISHIMOTO T. Interleukin-6 and its receptor in autoimmunity. **J Autoimmun.** Apr; 5 Suppl A:123-32, 1992.

KISHIMOTO T. The biology of interleukin-6. **Blood**, v.74, p.1-10, 1989.

KLUGER, M.J. et al. Cytokines in fever. **Neuroimmunomodulation**, v.2., p.216-223, 1995.

- KNOBEL, E. Óxido nítrico e sepse, **Arq. Bras. Cardiol.**, v.67, n.4, 1996.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, E.N. Inflamação aguda e crônica. In **Robbins patologia básica** cap.2, p.33-62, 2008.
- KWOK E.S.H., HOWES D., Use of Methylene Blue in Sepsis: A Systematic Review. **J Intensive Care Med.** 21: 359, 2006.
- LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology.** 4th ed. Iowa: Blackwell, 2003, 425p.
- LEEMAN, M.; BEYL V. Z.; DELCROIX, M.; NAEIJE, R. Effects of endogenous nitric oxide on pulmonary vascular tone in intact dogs **Am J Physiol Heart Circ Physiol** v.266 p.2343-2347, 1994.
- LIU, S.; ADCOCK, I.M.; OILD, R.W.; BARNES, P.J. et al. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA, **Biochem Biophys Res Commun** v. 196, p. 1208-1213, 1993.
- MackAY, R.J. Endotoxemia. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine 3.** Philadelphia: W.B. Saunders, p.225-232, 1992.
- MATHISON, J.C.; WOLFSON, E.; ULEVITCH, R.J. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram-negative lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. **J. Clin. Invest.**, v.81, p.1925-1937, 1988.
- MEIRELLES JR, Roberto Ferreira et al. Methylene blue improves hemodynamic shock but increases lipoperoxidation in severe acute pancreatitis pig model. **Acta Cir. Bra**, v.23, n.1, p. 8-16, 2008.
- MENARDI, A.C.; VIARO, F.; VICENTE, V.V.A; RODRIGUES, A. J.; EVORA, P.R.B. Estudos hemodinâmicos e da função endotelial em porcas saudáveis após injeção em bolus endovenoso de azul de metileno. **Arq. Brás. Cardiol.**, v.87, p.525-532, 2006.
- MIRZA, MH., et al. Detection and comparison of nitric oxide of clinically healthy

horses and those on naturally acquired strangulating large colon volvulus. **Can. J. Vet. Res. Apr**; v. 69, n. 2, p. 106-115, 2005.

MOORE, J.N. et al. Equine endotoxemia: an insight into cause and treatment. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.179, n.5, p.473-477, 1981.

MOORE, J.N. II: a perspective on endotoxemia. In: ANNUAL AAEP CONVENTION, San Diego, 2001. Proceedings. San Diego: **American Association of Equine Practitioners**, p.61-74, 2001.

MOORE, J.N.; BARTON, M.H. Na update on endotoxaemia Part 1: mechanisms and pathways. **Equine Veterinary Education**, v. 10, n.6, p.300-306, 1998.

MOORE, R.M. et al. Systemic and colonic venous plasma eicosanoid and endotoxin concentrations, and colonic venous serum tumor necrosis factor and interleukin-6 activities in horses during low-flow ischemia and reperfusion of large colon. **Am. J. Vet. Res.**, v.56, n.5, p.656-663, 1995.

MOORE, J., N. Endotoxemia and septicemia as causes of shock. In COLAHAN, P.T., et al. **Equine medicine and surgery**. 5 ed., St. Louis: Mosby, p.218-224, 1999.

MOORE, J., N. et al. Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis: A preliminary report. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, p.722-723, 1979.

MOORE, J., N. II: Perspective on endotoxemia. In: **AAEP** (proceedings of the annual convention of the AAEP), San Diego, p.61-74, 2001.

MOORE, J., N. Pathophysiology of circulatorishock. In WHITE II, N.A. **The equine acute abdomen Malvern**: Lea & Febiger, p.90-100, 1990.

MOORE, J., N., MORRIS, D.D. Endotoxemia and septicemia in horse: experimental and clinical correlates. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.200, n.12, p.1903-1914, 1992.

MORRIS, D.D.; MOORE, J.N.; CROWE, N. Serum tumor necrosis factor activity in horses with colic due to gastrointestinal disease. In: EQUINE COLIC

SYMPOSIUM, Georgia, **Proceedings. Athens: Georgia Center for Continuing Education**, P.38, 1991.

MUIR, W.W., HUBBELL, J.A.E. **Equine Anesthesia**. St Louis: Mosby-Year Book, cap. 11: Standing chemical restraint in horses: tranquilizers, sedatives, and analgesics, p. 247-280, 1991.

OLSON, N.C.; HELLYER, P.W.; DODAM, J.R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. **Br. Vet. J.**, London, v.151, p.489-522, 1995.

OZAL E, KURALAY E, YILDIRIM V, KILIC S, BOLCAL C, KUCUKARSLAN N, GUNAY C, DEMIRKILIC U, TATAR H. Preoperative methylene blue administration in patients at high risk for vasoplegic syndrome during cardiac surgery. **Ann Thorac Surg** v.79, p.1615–1619, 2005.

PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun** v.153, p. 1251-1256, 1988.

PARK, Y.C. et al. Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.240, p.692-96, 1997.

PARRILLO, J.E.; PARKER, M.M.; NATANSON, C. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann Intern Med.** v.113, p.227-242, 1990.

PEIRÓ, J. R. Aspectos clínico-laboratoriais e inflamatórios da injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) em eqüinos: efeitos da lidocaína. **Tese de Doutorado** apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade do Estado de São Paulo – UNESP. Campos de Jaboticabal. Jaboticabal, 2002.

PREISER, J.C.; LEJEUNE, P.; ROMAN, A.; CARLIE, E.; De BACKER, D.; LEEMAN, M. Methylene blue administration in septic shock: a clinical trial. **Crit. Care Med.**, v.23, p.259-264, 1995.

RALSTON, S.L. Insulin and glucose regulation. **Veterinary Clinical North American Equine Animal Practice.**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 295-304, 2002.

REMICK et al. Acute in vivo effects of human recombinant tumor necrosis factor. **Lab. Invest.**, v.55, p.583-590, 1987.

RIBEIRO, N.A.M.; STOLF, N.A.G.; SILVA JUNIOR, A.F.; VIANA, V.J.C.; CARVALHO, E.N.; ATHANÁZIO, R.; REIS, M.G.; OLIVEIRA, S.A. Efeito do azul de metileno na resposta inflamatória em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 19, n. 1, p. 17-23, 2004.

RIPPE, B.; HARALDSSON, B. Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. **Physiol Rev.** n.74, p. 163-219, 1994.

RIETSCHEL, E.V. et al., Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicemia. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.31, Suppl., p.8-21, 1982.

ROCHA, N.P.; FERREIRA, S.H. Restoration by levamisole of endotoxin-inhibited neutrophil migration, oedema and increased vascular permeability induced by carrageenin. **Eur. J. Pharmacol.**, v.122, p.87-92, 1986.

ROSA, P.C.; PEIRÓ, J.R.; CAMPEBELL, R.C.; et al. effects of diclofenac and dexamethasone on horse experimental endotoxemia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55, p.279-286, 2003.

SANGEETA, M. D. et al. Acute oxygenation response to inhaled nitric oxide when combined with high-frequency oscillation in adults with acute respiratory distress syndrome. **Crit. Care Med.**, v.31, n.2, 2003.

SOUZA, A.H. Efeitos do pré-tratamento com amitraz sobre a febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* ou interleucina1- β em coelhos. Dissertação (mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

SPANGELO, B.L.; GAROSPE, W.C. Role of cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. **Frontiers Neuroendocrinology**, v.16, p.1-22, 1995.

SPEIRS, V.C. **The alimentary tract: clinical examination of horses**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 261-298, 1997.

TAKAGUCHI, M.; FUJINAGA, T.; NAIKI, M.; MIZUNO, S.; OTOMO, K. Isolation, characterization, and quantitative analysis of c-reactive protein from horses. **American Journal Veterinary Research**, v.51, p.1215-1220, 1990.

THIEMERMANN, C. The role of arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock. **Advances in Pharmacol.** (in press), 1993.

TODA, N. Nicotine-induced relaxations in isolated canine cerebral arteries. **J. Pharmacol** v.193, p. 376-384, 1975.

TODA, N. Non-adrenergic, non-cholinergic innervations in monkey and human cerebral arteries. **Br. J. Pharmacol** v.72, p. 281-283, 1981.

TODA, N.; OKAMURA, T. Possible role of nitric oxide in transmitting information from vasodilator nerve to cerebroarterial muscle. **Biophys Res. Commun** n.170, p. 308-313, 1990.

TRACEY, K.J. et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone response in the dog. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v.164, p.415-422, 1992.

TRACEY, K.J. et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, v.234, p.470-474, 1986.

TRUMEL, C.; SCHELCHER, F.; BRAUM, J. P.; GUELFY, J. F.L., electrophoresis des protéines sériques: principes d'interprétation chez le chien, le chat et le cheval. **Revue de Médecine Veterinaire**, v.147, p.123-130, 1996.

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), **ARS Vet.**, v.24 n.3, p. 148-152, 2008.

VALADÃO, C.A.A. et al Evaluation of peritoneal fluid in horses with experimental endotoxemia. **J. Equine Vet. Sci.**, v.15, n.3, p.124-128, 1995.

VALADÃO, C. A. A. Endotoxemia no abdome agudo eqüino: causas e conseqüências. In: II Simpósio Internacional do Cavalo Atleta e IV Semana do Cavalo, 2005, Belo Horizonte - MG. **Anais do II Simpósio Internacional do Cavalo Atleta e IV Semana do Cavalo**. Belo Horizonte - MG, p. 39-45, 2005.

VAN DER POLL, T.; LOWRY, S.F. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? **Shock**, v.3, n.1, p.1-12, 1995.

WILD, J.M. et al. the effects of naloxone on endotoxic and hemorrhagic shock in horse. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v.44, n.2, p.227-238, 1984.

ZHANG, H., P. ROGIERS, J. C. PREISER, H. SPAPEN, P. MANIKIS, G. METZ, AND J. L. VINCENT. Effects of methylene blue on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock. **Crit Care Med** 23:1711-1721, 1995.

ZIEGLER, E.J. et al. treatment of gram negative bacteremia in shock with human anti-serum to a mutant Escherichia coli. N. Engl. **J. Med.**, v.307, p.1225-1230, 1982.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)