

## **INFLUÊNCIA DO AZUL DE METILENO NOS SINAIS CLÍNICOS DE EQUÍNOS COM OBSTRUÇÃO EXPERIMENTAL DO JEJUNO ASSOCIADA A EXPOSIÇÃO AO LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)**

**INFLUENCE OF METHYLENE BLUE IN THE CLINICAL SIGNS OF HORSES WITH EXPERIMENTAL OBSTRUCTION OF JEJUNUM ASSOCIATED TO THE EXPOSITION TO LIPOLISACHARIDE (LPS)**

**A. D. P. URIBE<sup>1</sup>, C. A. A. VALADÃO<sup>2</sup>, A. E. SANTANA<sup>3</sup>**

### **RESUMO**

As manifestações exacerbadas de dor fazem com que o diagnóstico precoce dos distúrbios abdominais que comprometem o intestino delgado seja de vital importância. O objetivo deste ensaio foi estudar os efeitos do azul de metileno sobre a resposta clínica antes e após a obstrução experimental do jejuno. Oito eqüinos machos, da raça Mangalarga Paulista, com peso variando entre 350 e 400 kg, foram expostos ao LPS e posteriormente foram submetidos à obstrução experimental do jejuno. Em quatro animais, grupo 1 (G1), foi administrada, via intravenosa, solução de azul de metileno, a 1%, imediatamente antes da obstrução experimental. Em outros quatro animais, grupo 2 (G2), a mesma foi administrada imediatamente antes da desobstrução do segmento intestinal. Os eqüinos foram submetidos à avaliação das variáveis clínicas durante 12 horas de estudo. Com base nos achados clínicos concluiu-se que, a administração do azul de metileno amenizou de maneira mais eficiente as alterações clínicas induzidas pelo modelo experimental proposto nos animais que receberam a solução imediatamente antes da desobstrução do jejuno.

**PALAVRAS-CHAVE:** Jejuno. Eqüino. Isquemia. LPS. Azul de metileno.

### **SUMMARY**

Expressions of pain exacerbated make the early diagnosis of abdominal disorders that compromise the small intestine is of vital importance. The objective of this test was to study the effects of methylene blue on the clinical response before and after the experimental obstruction of the jejunum. Eight male horses, Mangalarga Paulista, with weights ranging between 350 and 400 kg, were exposed to LPS and then were submitted to experimental obstruction of the jejunum. On 4 animals, group 1 (G1), was administered, intravenously, a solution of methylene blue, 1%, immediately before the experimental obstruction. In other 4 animals, Group 2 (G2), the solution was administered immediately before interrupt the obstructive process in the intestinal segment. The horses were submitted to the evaluation of clinical signs during the 12 hours of study. Based on the clinical findings concluded that, the administration of methylene blue controlled more efficiently the clinical changes induced by the experimental model proposed in animals that received the solution immediately before clearing the jejunum.

**KEY-WORDS:** Jejunum. Equine. Ischemia. LPS. Methylene blue.

---

<sup>1</sup>Médica Veterinária. Doutoranda do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária FCAV-Unesp/Jaboticabal. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n 14884-900 Jaboticabal – SP - E-mail: apilaritau@hotmail.com

<sup>2</sup>Médico Veterinário. Professor Adjunto ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV Unesp/Jaboticabal.

<sup>3</sup>Médico Veterinário. Professor Adjunto ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV Unesp/Jaboticabal.

## INTRODUÇÃO

O abdômen agudo é a principal causa de óbito em equinos. Dentre suas etiologias, são frequentes as afecções acompanhadas de isquemia e reperfusão (IR) no intestino (RIO TINTO et al., 2000). Os distúrbios associados à IR têm grande importância devido às elevadas taxas de prevalência e de óbito. As enfermidades intestinais primariamente associadas à isquemia compreendem os infartos, sem estrangulação, e as obstruções com estrangulações (SULLINS et al., 1985).

As manifestações clínicas das diversas etiopatogenias que causam obstruções do intestino delgado com estrangulamento vascular são bastante semelhantes, com exceção dos casos de intussuscepção que nas fases iniciais assemelha-se à manifestação clínica da obstrução do intestino delgado sem estrangulamento vascular (ANDERSON, 1992).

Obstruções intestinais estrangulantes do intestino delgado incluem encarceramentos, intussuscepções e vólvulos, e representam a causa mais comum de crises de abdômen agudo em equinos. Podem também acontecer secundariamente a má-formações anatômicas, como no caso da hérnia inguinoescrotal e do encarceramento decorrente de alterações mesentéricas. O vólvulo ocorre por enlaçamento de trechos do jejuno, envolvendo extensão relativamente grande da alça intestinal. A predisposição fundamental para essa ocorrência é a hiperperistalse e a condição anatômica de mesentério amplo e livre na cavidade abdominal. Quanto às torções, embora mais raras, ocorrem no eixo longitudinal da alça intestinal, torcendo o mesentério com seus vasos em torno da alça intestinal. Já os encarceramentos mais frequentes são os que acontecem através dos anéis inguinais, forâmes de Winslow e nos defeitos mesentéricos. As alças intestinais, geralmente no trecho final do jejuno e íleo, se insinuam, ficam encarceradas e podem sofrer estrangulamento, na dependência da quantidade de alça, do volume de ingesta e do diâmetro da região anatômica que propiciou o processo (THOMASSIAN, 1996).

O desconforto abdominal é agudo com quadro doloroso severo, contínuo é incontrolável. O cavalo pateia constantemente o solo, alternando os membros anteriores, rola no chão e se apresenta excitado no início da crise, e revela-se deprimido nas fases finais. Geralmente ocorre refluxo nasogástrico espontâneo que será mais precoce quanto mais próxima estiver à obstrução do estômago, ou quanto mais extensa for a área intestinal atingida. Convém lembrar que, em virtude da oclusão total do lúmen do intestino e da intensa perda líquida e eletrolítica para o intestino delgado ocluído, o refluxo enterogástrico será grande, podendo causar dilatação gástrica aguda e ruptura. Em razão das grandes perdas líquidas e dos desequilíbrios eletrolítico e ácido-base, que se instalam, além da intensa toxemia, o cavalo apresentará conjuntivas congestas, tempo de preenchimento capilar quase sempre acima de seis segundos, frequência cardíaca acima de 70 batimentos por minuto, e respiratória

acima de 40 movimentos por minuto. O quadro clínico se traduz por extrema gravidade onde as depleções que o organismo sofre, relativos ao aparelho cardiovascular, evoluem rapidamente, levando o animal a morte em menos de 24 horas (THOMASSIAN, 1996).

Com o acúmulo de informações a respeito da fisiopatogenia das lesões isquêmicas, difundiu-se o conceito de que a reperfusão em tecidos isquêmicos, apesar de essencial para prevenir a morte celular por anoxia, produz efeito paradoxal de agravamento das lesões pré-existentes, o que se convencionou chamar de lesão de reperfusão (FLAHERTY e WEISFELDT, 1988). Essa descoberta possibilitou vislumbrar novos horizontes no tratamento das doenças de origem isquêmica, ressaltando a necessidade de se associar à terapêutica cirúrgica clássica, procedimentos visando prevenir ou atenuar o agravamento das lesões decorrentes de reperfusão.

Isto posto, objetivou-se avaliar as manifestações clínicas decorrentes do processo obstrutivo estrangulante do intestino delgado associado ao uso preventivo e terapêutico do azul de metileno.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados oito equinos machos castrados, da raça Mangalarga Paulista, adultos hígidos, com idades variando entre quatro e oito anos, pesando entre 340 e 400 kg e com escore corporal de 3 a 4 em uma escala de 1 a 5 segundo Speirs (1997). Os equinos foram desverminados com 200 mcg/kg de ivermectina, e mantidos por 15 dias em piquete coletivo com suplementação à base de feno de *Coast cross (Cynodon dactylon)*, ração comercial, sal mineral e água *ad libitum*. Após esse período foram distribuídos dentro de diferentes grupos experimentais<sup>4</sup>. Para a indução da endotoxemia, após doze horas de jejum sólido os animais foram levados ao tronco de contenção e a endotoxemia foi induzida nos dois grupos pela administração intravenosa de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano de *E. Coli* 055:B5 (Sigma), na dose de 50 ng/kg diluída em 50 ml de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%, infundida lentamente durante 30 minutos. Esse procedimento foi efetuado sempre no período da manhã, entre 7h30min e 8h. Os parâmetros obtidos de cada animal na primeira colheita, antes da administração da endotoxina, foram considerados como dados basais de cada grupo experimental (T0 - tempo zero). Para a obstrução experimental, uma hora e trinta minutos após da indução da endotoxemia, os animais voltaram para o tronco de contenção e foram sedados. Após anti-sepsia, procedeu-se anestesia local infiltrativa em “L” invertido (TURNER e McILWRAITH, 2002), na fossa sublombar esquerda. A uma distância intermediária entre a tuberosidade ilíaca e a 18ª costela e 3 cm ventralmente ao músculo longo dorsal, foi realizada incisão de 6 a 8 cm e introduziu-se a mão na cavidade abdominal,

<sup>4</sup>Processo nº 12471-07 da comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV/Unesp-Jaboticabal.

identificou-se o intestino delgado por palpação, a partir do seu limite aboral, entre o íleo e o ceco, mediante identificação da prega íleo-cecal, por tração, exteriorizou-se o órgão. Uma vez identificada a prega íleo-cecal, isolou-se segmento de 30 cm de jejuno e uma ligadura firme foi feita com dreno de Penrose nº3 aplicada ao redor desse segmento de modo a ocluir a irrigação mesentérica determinando assim o modelo experimental de obstrução estrangulante seguido neste estudo e, posteriormente, o segmento exposto foi reposicionado na cavidade peritoneal e a parede abdominal foi suturada, em planos. O período de obstrução experimental foi de três horas, após o que os animais voltaram ao tronco de contenção e após sedação, foi abordada novamente a cavidade abdominal utilizando-se a via de acesso inicial, desfez-se a sutura anteriormente aplicada e abordou-se a cavidade abdominal. Mediante palpação identificou-se o segmento obstruído expondo-o cuidadosamente e procedeu-se a desfazer a ligadura cortando o dreno com tesoura, liberando-se a porção do intestino delgado determinada para estudo. Posteriormente o segmento desobstruído foi reposicionado na cavidade peritoneal e a parede abdominal foi suturada, em planos, por meio de padrão simples contínuo com fio de nylon calibre 0,60.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: *a) G1 - Grupo 1 (LPS – AM)*: Nos quatro animais desse grupo inicialmente foi induzida a endotoxemia, uma hora e quinze minutos depois foi administrado solução de Azul de metileno (AM) por via intravenosa e quinze minutos depois da administração do AM foi realizada a obstrução experimental do jejuno. Decorridas três horas da administração do AM, solução de cloreto de sódio a 0,9% (solução salina) foi administrada por via intravenosa, em volume equivalente ao volume da solução de AM, e quinze minutos depois procedeu-se a desfazer a obstrução. *b) G2 - Grupo 2 (LPS – Sal)*: Nos quatro animais desse grupo inicialmente foi induzida a endotoxemia, uma hora e quinze minutos depois foi administrada solução de cloreto de sódio a 0,9% (solução salina) por via intravenosa e quinze minutos depois da administração da solução salina foi realizada a obstrução experimental do intestino delgado. Decorridas três horas da administração de solução salina, solução de AM foi administrado por via intravenosa, em volume equivalente ao volume da solução salina e quinze minutos depois procedeu-se a desfazer a obstrução.

Os parâmetros clínicos foram avaliados imediatamente antes da indução da endotoxemia (T0) e 1,5 horas (T2); 4,5 horas (T4); 6 horas (T5); 7,5 horas (T6); 9 horas (T7); 10,5 horas (T8) e 12 horas (T9).

As variáveis clínicas avaliadas em cada tempo foram: frequência cardíaca (FC, batimentos/min) por meio de auscultação com estetoscópio, frequência respiratória (FR, respiração/min) por observação da movimentação do gradil costal durante a inspiração e expiração, temperatura retal (TR, °C) por meio de termômetro clínico convencional, e tempo de preenchimento capilar (TPC, seg) por compressão da

mucosa oral da arcada superior determinando-se o tempo em segundos para o desaparecimento da impressão digital. Também foram avaliadas a coloração das membranas mucosas conjuntival e oral, consistência e coloração das fezes, pulso da artéria digital e temperatura do casco por sensação tátil, atitude e postura ao decorrer do período experimental. As mucosas orais foram classificadas, de acordo com sua coloração em: rósea pálida, rósea (normal), levemente congesta, congesta, congesta vermelho tijolo com presença de halo toxêmico e cianóticas. As fezes foram classificadas, de acordo com a consistência em: cíbalos arredondados de consistência firme, pastosos e de consistência líquida (diarréia); e de acordo com a sua coloração em verdes e esbranquiçados.

Para a análise estatística, os dados obtidos para cada parâmetro estudado, nos diferentes grupos experimentais, foram submetidos à análise de variância pelo Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com parcelas subdivididas por intermédio do programa GENES<sup>5</sup>, seguida da comparação das médias pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para os diferentes tempos. Utilizou-se o teste Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0,05$ ) para a comparação dos grupos para cada tempo e por cada parâmetro. Os parâmetros clínicos (atitude, coloração das mucosas, consistência e coloração das fezes, temperatura do casco e pulso digital) foram apresentados de forma descritiva.

## RESULTADOS

Decorridos 60 minutos da aplicação de LPS, todos os animais apresentaram-se deprimidos. No G1 sinais de dor abdominal moderada foram evidentes duas horas após a injeção (HAI) de LPS sendo mais intensas a partir de 6 HAI (T5) e, mantiveram-se durante as seis horas seguintes. Os animais desse grupo apresentaram inquietação, movimentos de cavar com os membros anteriores e deitaram sem rolar. No mesmo grupo foi necessária a passagem da sonda nasogástrica 7,5 HAI, por intermédio da qual foram evacuados em média, 10 L de refluxo gastrointestinal. A sonda nasogástrica foi mantida até o final do período de estudo, sendo evacuadas pequenas quantidades de refluxo de forma intermitente. Por sua vez, nos animais do G2, os sinais de dor abdominal foram leves entre as duas e as seis HAI, após esse período, comportaram-se normalmente. A consistência e o aspecto das fezes nos animais dos dois grupos não se alteraram no decorrer do experimento. Não houve aumento da temperatura da muralha do casco em nenhum dos grupos. Foram observados movimentos de troca de apoio em um animal do grupo G1 e um do G2, coincidentemente a partir das 9 HAI. A congestão das membranas mucosas no G1 evidenciou-se a partir das 4,5 HAI, 3 animais do G2 apresentaram congestão às 4,5 HAI retornando à coloração normal 1,5 horas após. Elevação da FC ocorreu a partir das 7,5 HAI nos animais do grupo G1 e das 9 HAI naqueles do G2 em comparação aos valores

<sup>5</sup>GENES® Aplicativo Computacional em Genética e Estatística for Windows Versão 0.0 – 2007.

basais ( $p \leq 0,05$ ). A TR elevou-se no G1 a partir das 6 HAI e no G2 a partir das 7,5 HAI em confrontação com os valores registrados no início do experimento ( $p \leq 0,05$ ). Aumento do TPC observou-se às 12 HAI no

G1 em relação aos valores basais. Não foram detectadas diferenças significativas na FC nos grupos estudados. As médias da FC, FR, TR e TPC estão representadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Valores médios do tempo de preenchimento capilar, temperatura retal e frequências cardíaca e respiratória de equinos submetidos à obstrução experimental do jejuno e expostos ao LPS, após administração de Azul de Metileno.

Parâmetro	Grupos	Tempo								
		T0	T2	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
FC (bat/min)	G1 Média	32a	56a	49,8a	58b	73,8b	80b	84,5b	89b	
	G2 Média	32,8a	43a	42,5a	52a	55,3a	66,5b	73b	67b	
FR (mov/min)	G1 Média	9,8	19,5	22,5	18,5	23,5	21,5	31	30,3	
	G2 Média	14	35,5	30,5	24,5	22,5	34,5*	28,8	29,5	
TPC (segundos)	G1 Média	1,8a	2a	2,5a	3,5a	3,5a	3,3a	3,8a	4,3b	
	G2 Média	2	2,3	2,5	3,3	2,8	3,3	3,3	3,3	
TR (°C)	G1 Média	36,3a	36a	37,6a	38,1b*	38b	38,3b	38,1b	38,2b	
	G2 Média	35,7a	36a	36,8a	36,6a	37,3b	38,1b	38b	38,4b	

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). \* Difere entre os grupos para um mesmo tempo ( $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

O acesso cirúrgico ao terço médio do jejuno pelo flanco esquerdo com o equino em posição quadrupedal, apesar de ser uma técnica pouco utilizada, se mostrou bastante eficiente para exposição e manipulação do jejuno. A abordagem com sucesso para o tratamento cirúrgico da obstrução simples do jejuno já havia sido relatada por Susko (1993).

A depressão, inquietação e inapetência aos 60 minutos confirmaram a instalação do processo endotoxêmico em todos os animais. Os sinais de cólica moderada caracterizadas por inquietação, movimentos de cavar com os membros anteriores e deitar sem rolar, presentes de forma mais intensa nos animais do G1 estão relacionados também, ao processo obstrutivo estrangulante intestinal, fato observado mais discreto nos animais do G2.

A presença do refluxo nasogástrico no G1 ocorrido de forma espontânea seria em virtude da total oclusão do lúmen do intestino.

Embora todos os animais do G1 apresentaram sinais moderados de dor visceral, troca de apoio foi observada em um animal de cada grupo, podendo ser indicadora do desconforto abdominal decorrente dos procedimentos cirúrgicos e da obstrução.

A congestão das membranas mucosas e o aumento da frequência cardíaca dominaram o quadro clínico, responsivo à presença de endotoxinas circulantes e seu comprometimento com a performance cardiovascular.

A resposta febril observada em todos os animais a

partir das 6 HAI, foi tardia em relação àquela observada por Clark e Moore (1989), Valadão et al. (1995) e Krumrych et al. (1997) subsequentemente à injeção intravenosa de LPS. A febre é uma das alterações mais consistentes induzidas pela administração de LPS (FEESLER et al., 1989). A endotoxina circulante, associada à liberação de mediadores inflamatórios pelo organismo durante o processo endotoxêmico, parece influenciar o centro termorregulador hipotalâmico, elevando a temperatura corpórea.

Não foram observados durante o período experimental alterações significativas na frequência respiratória em nenhum dos grupos.

Na análise das divergências entre os dois grupos há de se considerar as diferenças entre os momentos de administração do azul de metileno.

## CONCLUSÕES

Com base nos achados clínicos deste estudo pode-se concluir que:

- O modelo proposto de obstrução estrangulante do jejuno associado à exposição ao LPS se mostrou efetivo, pois foi capaz de promover alterações significativas nos parâmetros clínicos.

- O azul de metileno foi um agente seguro na dose empregada, não induzindo efeitos colaterais.

- As alterações significativas nas variáveis clínicas e a manifestação de dor moderada corrobora com as observações clínicas prévias que relatam que a

sintomatologia do abdômen agudo originado no intestino delgado é mais evidente quando comparado àquelas relatadas para enfermidade localizadas em outros segmentos do trato gastrointestinal equino.

- A aplicação intravenosa de azul de metileno poderia auxiliar no tratamento de doenças inflamatórias da cavidade peritoneal, uma vez que os achados clínicos não apresentaram alterações como as descritas para os processos obstrutivos do intestino delgado.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, N. **Veterinary Gastroenterology**. 2 ed. Lea e Febiger: Malvern, Pennsylvania, USA. 1992. Cap.11.

CLARK, E. S., MOORE, J. N. The effects of a slow infusion of a low dosage of endotoxin in healthy horses. **Equine Vet. J.**, suple.7, p.33-37, 1989.

FLAHERTY, J. T., WEISFELDT, M. L. Reperfusion injury. **Free Rad Biol Med.**, v.5, n.9, p.409-419, 1988.

FEESLER, J. F., BOTTOMS, G. D. Plasma endotoxin concentrations in the experimental and clinical equine and canine subjects. **Vet. Surg.**, Hagerstown, v.17, p.32, 1988.

KRUMRYCH, W., et al. Activation of blood neutrophils in horses with use of different doses of endotoxin. **Bull. Vet. Inst. Pulaway**, v.41, p.41-47, 1997.

RIO TINTO, J. J. M., ALVES, G. E. S., FALEIROS, R. R. et al. Lesões de isquemia e reperfusão no intestino de equinos: fisiopatologia e terapêutica.

*Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n., p.1083-1093, 2000.

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

SULLINS, K. E., STASHAK, T. S., MERO, K. N. Pathologic changes associated with induced small intestinal strangulation obstruction and nonstrangling infarction in horses. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v.46, n.4, p.913-916, 1985.

SUSKO, I. **Modelo experimental de obstrução do terço médio do jejuno em equinos: avaliações clínicas, hematológicas, bioquímicas, hidro-eletrolíticas, do equilíbrio ácido-base e anátomo-patológicas**. 204p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1993.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos cavalos**. Livraria Varela. 3 ed. 1996. 643 p.

TURNER, A. S., McILWRAITH, C. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Editora Roca, 2002. p.11.

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