

Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em eqüinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

[*Escherichia coli* lipopolisaccharide (LPS) induced endotoxemia in horses: effects of anti-inflammatory drugs on seric and peritoneal tumor necrosis factor alpha (TNF- α) concentrations]

R.C. Campbell¹, J.R. Peiró², P.C.S. Rosa³, C.A.A. Valadão⁴, G.H. Bechara⁴

¹Departamento de Medicina Veterinária - UPIS
SEP Sul EQ 712/912 Conj. A
70390-125 – Brasília, DF

²Curso de Medicina Veterinária - UNESP – Araçatuba, SP

³Médica veterinária autônoma – Jaguariúna, SP

⁴Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Jaboticabal, SP

RESUMO

Avaliou-se a inibição da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) devido ao pré-tratamento com antiinflamatório esteroide (dexametasona) e não esteroide (diclofenaco sódico) em eqüinos com endotoxemia induzida experimentalmente. Foram utilizados 15 cavalos machos não castrados, distribuídos em três grupos de cinco animais: controle (C), diclofenaco sódico (DS) e dexametasona (DM). A endotoxemia subletal foi induzida pela infusão intravenosa (IV) de 0,1 μ g/kg/pv de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* 055:B5, administrado em 250ml de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%, durante 15min. Os cavalos do grupo-controle foram tratados com solução de cloreto de sódio a 9% IV. Nos animais do grupo DS, administraram-se, por via oral, 2,2mg/kg de diclofenaco sódico e, nos do grupo DM, 1,1mg/kg de dexametasona IV, respectivamente, 60 e 30min antes da infusão da endotoxina. Mensurou-se, por meio de ensaio de toxicidade com células da linhagem L929, a concentração de TNF- α no soro e no líquido peritoneal às 0, 1^{1/4}, 3 e 6 horas após injeção do LPS. No grupo-controle, observou-se aumento significativo de TNF- α sérico, em relação ao valor basal e aos grupos DS e DM, 1,15 horas após a indução da endotoxemia. No líquido peritoneal, as concentrações observadas estavam abaixo daquelas da curva padrão de TNF- α , não havendo diferença entre os grupos ($P>0,05$).

Palavras-chave: eqüino, citocina, TNF- α , endotoxemia, dexametasona, diclofenaco sódico

ABSTRACT

*The inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production due to pre-treatment with steroidal (dexamethazone) and non-steroidal (sodium diclofenac) anti-inflammatories was studied in horses under experimentally induced endotoxemy. Fifteen stallions were allotted into three groups of five animals each: control (C), sodium diclofenac (SD) and dexamethazone (DM). Sublethal endotoxemy was induced with 0.1 μ g/kg/bw *Escherichia coli* 055:B5 lipopolysaccharide (LPS), IV, administrated in 250ml of 0.9% sterile sodium chloride, during 15 minutes. Control group horses received 9% sodium chloride, IV. SD group animals were orally administrated 2.2mg/kg sodium diclofenac and DM horses received 1.1mg/kg dexamethazone, IV, 30 and 60 minutes before endotoxin infusion, respectively. TNF- α concentration was measured in serum and peritoneal fluid by toxicity assay using L929 lineage cells at 0, 1^{1/4}, 3 and 6 hours after LPS injection. Ninety minutes after endotoxemy induction, it was verified a significant increase of serum TNF- α concentration in horses from control group in relation to the basal values as well as results of horses from SD and DM groups. In peritoneal fluid, the measured concentrations were lower than those from TNF- α standard curve and difference among the groups was not verified ($P>0.05$).*

Keywords: cytocin, dexamethazone, sodium diclofenac, endotoxin

Recebido em 26 de janeiro de 2006

Aceito em 2 de abril de 2007

E-mail: campbell@upis.br

INTRODUÇÃO

A síndrome clínica conhecida como endotoxemia, que ocorre subseqüentemente às desordens gastrintestinais que causam cólica (Moore, 1988) ou devido a septicemia por bactérias Gram-negativas, provoca considerável morbidade e mortalidade dos eqüinos (Morris, 1984).

Apesar de a endotoxina permanecer intimamente associada à membrana externa da bactéria viva, ela é liberada quando ocorre rápida replicação, lise ou morte bacteriana como resultado da exposição a toxinas ou antibióticos (Olson et al., 1995).

As alterações clínicas mais comuns em eqüinos endotoxêmicos incluem anormalidades na coloração das membranas mucosas, com o aparecimento de linha tóxica ao redor dos dentes, aumento do tempo de preenchimento capilar, elevação das freqüências cardíaca e respiratória, diminuição dos borborigmos intestinais, febre, hemoconcentração e trombocitopenia. Alguns cavalos podem exibir sinais de dor abdominal, enquanto outros parecem ficar deprimidos (Moore, 2001).

Dentre as respostas às injeções de LPS em baixas concentrações, a liberação de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), tem um papel importante na resposta endotoxêmica, sendo detectado em quantidade significativa no soro de pessoas e animais endotoxêmicos (Ward et al., 1987).

O TNF- α é produzido por diferentes células da linhagem monocítica/macrofágica, em resposta a determinados estímulos tóxico-infecciosos, induzindo a ativação e a estimulação celular modulando mediadores inflamatórios, enzimas, proteínas da fase aguda, e ainda outras citocinas como interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) (Beyaert e Fiers, 1998). Uma vez liberado nos tecidos ou na circulação, o TNF- α age sobre os neutrófilos aumentando a atividade fagocítica, a citotoxicidade e a produção do ânion superóxido e de H₂O₂, além de estimular a degranulação e a aderência dessas células ao endotélio (Beyaert e Fiers, 1998). Ativa a fosfolipase A₂ e desencadeia a produção de fator ativador de plaquetas (PAF), aumenta a síntese de

catecolaminas, induz a febre e a expressão de antígenos de superfície das células endoteliais (Barton et al., 1996).

A atividade citotóxica do TNF- α foi avaliada no soro e no plasma de eqüinos tratados com LPS, constatando-se que as concentrações séricas da citocina se elevaram 15 a 30min após a indução da endotoxemia, alcançando um pico máximo ao redor de 60 a 90min e diminuindo por volta de 4 horas. Tal atividade sugere que a citocina seria o mediador inicial dos efeitos da endotoxina em eqüinos (Barton et al., 1996; Beyaert e Fiers, 1998; Bueno et al., 1999; Peiró et al., 1999).

Os fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) têm sido amplamente utilizados para atenuarem os efeitos adversos da endotoxina e por reduzirem a formação dos metabólitos do ácido aracdônico.

O diclofenaco sódico, um agente antiinflamatório não esteroidal, derivado do ácido fenilacético, inibe a síntese de prostaglandina, por inibir a ciclooxigenase, a enzima que catalisa a formação dos precursores da prostaglandina, competindo com o ácido aracdônico, de maneira dose dependente, pela ligação com esta enzima (Ku et al., 1986; Scholer et al., 1986).

A dexametasona é um isômero da betametasona, usada extensivamente na medicina veterinária. Os glicocorticóides apresentam efeitos diferenciados no controle da endotoxemia, incluindo redução da produção de eicosanóides, inibição da síntese e também da atividade do TNF- α e IL-1 pelos macrófagos, estabilização das membranas e prevenção da ativação de neutrófilos (Harkins et al., 1993). O efeito inibitório dos glicocorticóides sobre a síntese de TNF- α só é efetivo se o tratamento ocorrer previamente ou concomitantemente ao estímulo com endotoxina, devido à expressão extremamente rápida desta citocina (Beyaert e Fiers, 1998).

Devido à necessidade da detecção e mensuração dos níveis de TNF- α em diversas afecções, várias técnicas têm sido desenvolvidas para a sua quantificação, por meio de imunoensaios (ELISA) e ensaios de citotoxicidade em cultivo celular, onde células susceptíveis são incubadas em meio contendo diluições seriadas de

preparações de citocinas ou amostras a serem testadas, sendo a atividade citotóxica estimada pela inibição de crescimento ou lise celular (Meager et al., 1989).

Para a pesquisa da citocina em eqüinos, têm se utilizado mais freqüentemente as linhagens de célula WEHI 164 clone 13 (Barton e Collatos, 1999; Peiró et al., 1999; Parviainen et al., 2001; Campebell et al., 2004) e L-929 (Hawkins et al., 1998). Bertone et al. (2001) utilizaram teste de imunoenensaio enzimático humano (ELISA) para identificar e quantificar a presença de TNF- α em fluido sinovial eqüino.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do pré-tratamento com diclofenaco sódico e dexametasona sobre os níveis de TNF- α no sangue e líquido peritoneal, em eqüinos com endotoxemia induzida por dose subletal (0,1 μ g/kg, IV) de LPS de *Escherichia coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Faculdade Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Jaboticabal. Foram utilizados 15 cavalos machos não castrados, da raça Mangalarga Paulista, com idade entre dois a três anos. Os animais foram mantidos em piquetes recebendo ração balanceada comercial¹, feno de *coast cross - Cynodon dactylon* L. e água à vontade. Em etapa anterior ao início do experimento, os animais foram submetidos ao exame físico, hematológico e bioquímico-sérico e, posteriormente, foram vermifugados com ivermectina². Os eqüinos foram distribuídos em três grupos de cinco animais cada: grupo-controle (C); grupo diclofenaco sódico (DS) e grupo dexametasona (DM).

A endotoxemia subletal foi induzida pela infusão intravenosa (IV) de 0,1 μ g/kg/pv de endotoxina de *E. coli* 055:B5³, administrada em 250ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, durante 15min. Os cavalos do grupo-controle foram tratados com solução de cloreto de sódio a 0,9%

IV, 30min antes da injeção de LPS. Nos animais do grupo DS, administraram-se, por via oral, 2,2mg/kg de diclofenaco sódico⁴ e, nos do grupo DM, 1,1mg/kg de dexametasona⁵ IV, respectivamente, 60 e 30min antes da infusão da endotoxina. O sangue periférico e o líquido peritoneal foram coletados às 0h, 1h15min, 3h e 6h após a injeção de LPS. Três alíquotas de 500 μ l de soro e líquido peritoneal foram separadas e armazenadas em tubos *ependorf*, congeladas a -10°C e, subseqüentemente, em freezer a -70°C para posterior mensuração do TNF- α .

Uma cânula mamária estéril foi inserida na cavidade abdominal, por meio de uma pequena incisão de pele feita em uma área preparada apropriadamente na região ventral do abdômen. O líquido peritoneal foi coletado em tubos estéreis contendo EDTA. Amostras de sangue foram obtidas por venopunção da jugular e acondicionadas em tubos estéreis contendo EDTA.

O ensaio de citotoxicidade, que se baseia na lise das células-alvo na presença da citocina, em meio de cultura, foi realizado utilizando-se de modificação de um bioensaio de citotoxicidade *in vitro*, estabelecido por Flick e Gifford (1984), com células da linhagem L929 de fibrossarcoma murino sensíveis ao TNF- α . Para cada diluição da amostra, foi realizada regressão linear com a densidade óptica (DO), a concentração (pg/ml) de TNF- α foi estimada a partir da diluição que produziu a DO média na curva padrão de TNF- α recombinante humano. Obtiveram-se, assim, os valores de TNF- α (pg/ml) no soro e líquido peritoneal.

Os dados foram apresentados como médias \pm erro padrão. Para detectar diferenças das médias entre os grupos, foi utilizada a análise de variância de uma via, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Para detectar diferenças entre os momentos, dentro de cada grupo, foi utilizada a análise de variância de repetições múltiplas de uma via. As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

¹Guabi Rações S.A. – Ribeirão Preto, SP – Brasil.

²Ivomec – Merial Saúde Animal Ltda – Campinas, SP – Brasil.

³Sigma Chemical Co. – St Louis, Mo – EUA.

⁴Farmavida – Bragança Paulista, SP – Brasil.

⁵Shering-Plough – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.

RESULTADOS

Foram observados aumentos nas concentrações de TNF- α no soro e líquido peritoneal até 6h após injeção de LPS. Depois desse período, a concentração da citocina foi mínima. Considerou-se, então, como tempo referencial na avaliação da concentração desta citocina até 6h pós-injeção de LPS.

No soro dos equinos do grupo C, observou-se aumento significativo de TNF- α 1h15min após a indução da endotoxemia (Tab. 1), tanto em relação ao valor basal, quanto aos dos grupos DS e DM. No líquido peritoneal, os valores obtidos revelaram-se abaixo daqueles da curva padrão de TNF- α , não ocorrendo nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais (Tab. 2).

Tabela 1. Valores médios e erro padrão da média da concentração sérica de TNF- α (pg/ml), após injeção intravenosa de 0,1 μ g/kg de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* nos grupos C (controle), DS (diclofenaco sódico) e DM (dexametasona), em equinos

Grupo	Tempo (horas)			
	0	1,15	3	6
C	20,1 \pm 1,65	23,4 \pm 0,26*#	21,7 \pm 0,53	21,2 \pm 0,93
DS	20,4 \pm 1,56	19,9 \pm 0,97	19,6 \pm 0,92	19,9 \pm 1,08
DM	20,1 \pm 1,12	20,2 \pm 0,54	19,7 \pm 1,06	19,2 \pm 1,72

*Diferença significante em relação ao valor basal. #diferença significante entre os grupos no momento indicado.

Tabela 2. Valores médios e erro padrão da média da concentração de TNF- α (pg/ml) no líquido peritoneal, após injeção intravenosa de 0,1 μ g/kg de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* nos grupos C (controle), DS (diclofenaco sódico) e DM (dexametasona), em equinos

Grupo	Tempo (horas)			
	0	1,15	3	6
C	0,62 \pm 2,98	1,24 \pm 3,01	1,40 \pm 3,67	0
DS	1,36 \pm 5,12	3,50 \pm 4,22	2,28 \pm 5,45	1,53 \pm 3,94
DM	0	0	0	0

DISCUSSÃO

Os efeitos patofisiológicos das bactérias Gram-negativas são similares aos da endotoxina bacteriana e a endotoxemia experimental é um modelo reconhecido para o estudo de choque séptico por Gram-negativos (Ward et al., 1987). Devido a essas similaridades, a administração de quantidade subletal de endotoxina a equinos permite o estudo de possíveis agentes terapêuticos para a cólica equina (Lochner, 1986). A dose de LPS de 0,1 μ g/kg usada neste estudo foi idêntica à utilizada por King e Gerring (1991) em pôneis e por Wagner et al. (1995) em equinos.

Conforme o relato de King e Gerring (1991), a endotoxina administrada por infusão intravenosa lenta, durante 15min, não produz alterações de início abrupto e severo, como as provocadas pela injeção intravenosa em *bolus*. A diferença de resposta parece estar relacionada ao fato de a

infusão lenta permitir um tempo maior para a formação de complexos estáveis do LPS com lipoproteínas de alta densidade do plasma e células do sangue, retendo o LPS na circulação, retardando a interação com os receptores (Moore, 2001).

A padronização dos animais, quanto ao sexo, origem e idade entre dois e três anos, foi importante para se obter uma resposta inflamatória uniforme, pois, segundo Allen et al. (1996) e Barton et al. (1996), equinos que já apresentaram doença gastrointestinal, têm menor produção de TNF- α nos macrófagos peritoneais quando expostos às endotoxinas, diferentemente dos macrófagos de animais sem histórico de afecção, sugerindo a ocorrência de tolerância à endotoxina. Apesar de o exato mecanismo da tolerância à endotoxina ainda não estar totalmente elucidado, a ocorrência de menor expressão dos receptores de endotoxina nas células alvo, a diminuição do início do sinal de

tradução e a diminuição de transcrição e translação (Barton et al., 1996) têm sido propostas.

A quantificação do TNF- α foi realizada inicialmente com células da linhagem WEHI 164 clone 13, mas resultados confiáveis só foram obtidos com linhagem de célula L929. Barton e Collatos (1999) relataram que diferenças nas técnicas de ensaios biológicos, no tipo de amostra e na definição de “aumento” de atividade de TNF- α podem induzir a variações na quantificação da citocina. Mackay et al. (1991), comparando os dois tipos de linhagens de células para quantificar a citocina em soro equino, observaram que a atividade do TNF- α das amostras séricas foi maior quando foram utilizadas células L929.

Adicionalmente, quando se empregou o imunoenensaio enzimático humano (ELISA) para quantificar a presença de TNF- α , como descrito por Bertone et al. (2001), não se obtiveram resultados fidedignos. Faleiros (2002)⁶ também quantificou a citocina por esse método e não obteve resultados positivos, demonstrando que a técnica ainda necessita de maior aperfeiçoamento.

Apesar de a maioria dos autores não citar quanto tempo após a coleta do material foi realizada a mensuração do TNF- α , Cargile et al. (1995) dosaram a citocina duas semanas após a colheita. Em relação à temperatura de armazenagem das amostras, segundo Mackay et al. (1991), a atividade do TNF- α equino é menor quando as amostras são congeladas a -20°C por mais que dois meses, porém estável em condições de temperatura a -80°C; todavia, esses autores relataram que a mensuração da atividade citotóxica do TNF- α para as células WEHI diminui ou desaparece antes que a das células L929.

A infusão IV de 20ng de endotoxina/kg, em equinos, resultou em um pico da atividade de TNF- α sérico de 1.014pg/ml, uma hora após a indução da endotoxemia (Barton et al., 1998). A concentração máxima da citocina de 23,4pg/ml, no grupo-controle, sugere que o armazenamento das amostras à temperatura de -70°C pode ter

contribuído para a redução da concentração do TNF- α , dificultando a quantificação deste pelos ensaios com a linhagem WEHI, embora haja evidência de que as células da linhagem L929 sejam mais sensíveis para mensuração de concentrações menores dessa citocina.

Dessa forma, foi detectada a maior atividade do TNF- α às 1h15min após a indução da endotoxemia, confirmando os dados da literatura sobre o aumento da atividade do TNF- α 15 a 30min após indução da endotoxemia, sendo máxima entre 1 e 2h (Beyart e Fiers, 1998; Bueno et al., 1999; Peiró et al., 1999; Peiró, 2002).

A atividade sérica do TNF- α está relacionada com elevação de temperatura corpórea, aumento da frequência cardíaca e da frequência e amplitude respiratória, diminuição da motilidade intestinal, sinais de depressão e neutropenia (Barton e Collatos, 1999). De fato, no estudo clínico realizado por Rosa et al. (2003), empregando esses mesmos equinos, o aumento da atividade da citocina descrita, foi coincidente com aumento da temperatura retal e a redução dos movimentos intestinais entre 1h15min e 6h após indução da endotoxemia, estando associada à leucopenia com neutropenia e linfopenia.

Observou-se que o diclofenaco sódico inibiu a síntese de TNF- α e atenuou os sintomas clínicos de hipertermia e hipomotilidade intestinal, por reduzir a ativação da cascata inflamatória. A ausência de resposta febril nos animais tratados com diclofenaco pode estar relacionada à atividade seletiva deste fármaco para a ciclooxigenase tipo 2 (Schwartz et al., 1999; Cannon, 2000), pois a isoforma da ciclooxigenase está envolvida no desencadeamento da síntese de prostanoídes que mediam a resposta inflamatória, dor e febre (Schwartz et al., 1999).

Segundo Rosa et al. (2003), a ausência de febre nos animais que receberam dexametasona neste experimento pode ter ocorrido pela diminuição ou inibição da produção de PGE₂ e, ainda, pela inibição da síntese de TNF- α (Morris et al., 1991). A dexametasona reduz a transcrição do gene TNF e a tradução do TNF RNAm (Beyaert e Fiers, 1998). Os equinos tratados com LPS não apresentaram redução da motilidade intestinal,

⁶Faleiros, 2002 (comunicação pessoal) – Escola de Veterinária - UFMG – Belo Horizonte, MG - Brasil

demonstrando a proteção promovida pelo fármaco. Essa dose de endotoxina causou inibição da atividade gástrica e da motilidade do cólon esquerdo e menor, mediados pelo aumento dos teores de prostaglandina PGE₂ e PGI₂ (King e Gerring, 1991).

Segundo Valadão et al. (1995), a endotoxemia induzida por via intravenosa em eqüinos, não altera o número total de leucócitos do líquido peritoneal. Nessa condição, não ocorre migração de células da corrente circulatória para a cavidade, pois o LPS circulante ativa a cascata inflamatória, alterando a quimiotaxia dos neutrófilos circulantes (Rocha e Ferreira, 1986).

Este último evento explicaria a ausência de alterações no número de leucócitos no líquido peritoneal e a leucopenia observada nos animais deste estudo (Rosa et al., 2003), em que a elevação da concentração de TNF- α sérico inibiu a transmigração de neutrófilos para o espaço extravascular. Embora a resposta leucopênica em eqüinos expostos ao LPS não pareça ser totalmente mediada pelo TNF- α , esta citocina desempenha um papel importante nesta e em outras espécies animais (Cargile et al., 1995; Peiró et al., 1999).

Reforça essa proposição o fato de o LPS administrado por via intraperitoneal não induzir leucopenia e neutropenia, mas aumentar o número de neutrófilos peritoneais (Peiró et al., 1999). Certamente, por esta via, o LPS ativou a migração de macrófagos, induzindo a participação de outros fatores além do quimiotático para neutrófilos (Souza e Ferreira, 1985; Cunha et al., 1986; Faccioli et al., 1990). Peiró (2002) observou aumento da atividade de TNF- α peritoneal, duas horas após injeção de LPS intraperitoneal, e somente após quatro horas, o aparecimento da citocina na circulação sanguínea.

Nesse sentido, Barton e Collatos (1999) observaram, em estudo clínico de 155 eqüinos com cólica, concentração de endotoxina e de TNF- α maiores no fluido peritoneal que no sangue, demonstrando que lesões locais na cavidade peritoneal induzem a resposta inflamatória compartimentalizada. Alterações celulares e na produção de TNF- α peritoneal, já foram

observadas em casos de endotoxemia (Burrows 1979).

Concluiu-se que a injeção de LPS, pela via endovenosa, aumentou os teores de TNF- α sérico, mas não os do líquido peritoneal, e que o diclofenaco e a dexametasona inibiram a produção de TNF- α sérico, em endotoxemia, induzida experimentalmente por LPS em eqüinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, G.K.; CAMPBELL-BEGGS, C.; ROBISON, J.A. et al. Induction of early-phase endotoxin tolerance in horses. *Equine Vet. J.*, v.28, p.269-274, 1996.
- BARTON, M.H.; COLLATOS, C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J. Vet. Intern. Med.*, v.13, p.456-464, 1999.
- BARTON, M.H.; COLLATOS, C.; MOORE, J.N. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. *Equine Vet. J.*, v.28, p.382-389, 1996.
- BARTON, M.H.; BRUCE, E.H.; MOORE, J.N. et al. Effects of tumor necrosis factor antibody given to horses during early experimentally induced endotoxemia. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.792-797, 1998.
- BERTONE, A.L.; PALMER, J.L.; JONES, J. et al. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. *Vet. Surg.*, v.30, p.528-538, 2001.
- BEYAERT, R.; FIERS, W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: MIRE-SLUIJS, A., THORPE, R. (Eds). *Cytokines*. California: Academic, 1998. p.335-360.
- BUENO, A.C.; SEABORN, T.L.; CORNICK-SAEBORN, J. et al. Plasma and urine nitric oxide concentrations in horses given below a low dose of endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, v.60, p.969-976, 1999.
- BURROWS, G.E. Equine *Escherichia coli* endotoxemia: comparison of intravenous and intraperitoneal endotoxin administration. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.991-998, 1979.
- CAMPEBELL, R.C.; PEIRÓ, J.R.; VALADÃO, C.A.A. et al. Effects of lidocaine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.56, p.281-291, 2004.
- CANNON, G.W. Rofecoxib, a specific inhibitor of cyclooxygenase 2, with clinical efficacy comparable with that of diclofenac sodium: results of a one-year, randomized, clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee and hip. Rofecoxib phase III protocol 035 study group. *Arthritis Rheum.*, v.43, p.978-987, 2000.
- CARGILE, J.L.; MACKEY, R.J.; DANKER, J.R. et al. Effects of treatment with a monoclonal antibody against equine tumor necrosis factor (TNF) on clinical, hematologic and circulating TNF responses of Miniature Horses given endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.1451-1459, 1995.

Endotoxemia por lipopolissacarídeo...

- CUNHA, F.Q.; SOUZA, G.E. P.; FERREIRA, S.H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *Eur. J. Pharm.*, v.129, p.65-76, 1986.
- FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q. et al. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. *Agents Actions*, v.30, p.344-349, 1990.
- FLICK, D.A.; GIFFORD, G.E. Comparison of in vitro cell cytotoxic assay for TNF. *J. Immunol. Methods*, v.68, p.167, 1984.
- HARKINS, J.D.; MacKAY, R.J.; MacKAY, S.L.D. et al. Clinical use and characteristics of the corticosteroids. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, v.9, p.543-562, 1993.
- HAWKINS, D.L.; CARNEY, J.M.; TOBIN, T. Human interleukin 10 suppresses production of inflammatory mediators by LPS-stimulated equine peritoneal macrophages. *Vet. Immun. Immunop.*, v.66, p.1-10, 1998.
- KING, J.N.; GERRING, E.L. The action of low dose endotoxin on equine bowel motility. *Equine Vet. J.*, v.23, p.11-17, 1991.
- KU, E.C.; LEE, W.; KOTHARI, H.V. et al. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am. J. Med.*, v.80, suppl. 4B, p.18-23, 1986.
- LOCHNER, F.K. The use of allopurinol in an endotoxin shock model in the horse. In: EQUINE COLIC RESEARCH SYMPOSIUM, Athens. *Proceedings...* Athens, 1986. p.39.
- MACKAY, R.J.; MERRIT, A.M.; ZERTUCHE, J.M. et al. Tumor necrosis factor activity in the circulation of horses given endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, v.52, p. 533-538, 1991.
- MEAGER, A.; LEUNG, H.; WOOLLEY, J. Assays for tumour necrosis factor and related cytokines. *J. Immun. Methods.*, v.116, p.1-17, 1989.
- MOORE, J.N. Recognition and treatment of endotoxemia. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, v.4, p.105-114, 1988.
- MOORE, J.N. A perspective on endotoxemia. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 47., Albuquerque. *Proceedings...*Albuquerque, 2001. p.61-74.
- MORRIS, D.D. Bacterial infections of the newborn foal. Part I: Clinical presentation, laboratory findings, and pathogenesis. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, v.6, p.A332-A341, 1984.
- MORRIS, D.D.; MOORE, J.N.; CROWE, N. et al. Dexamethasone reduces endotoxin-induced tumor necrosis factor activity production in vitro by equine peritoneal macrophages. *Cornell Vet.*, v.81, p.267-276, 1991.
- OLSON, N.C.; HELLYER, P.W.; DODAM, J.R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. *Br. Vet. J.*, v.151, p.489-522, 1995.
- PARVIAINEN, A.K.; BARTON, M.H.; NORTON, N.N. Evaluation of polymyxin B in ex vivo model of endotoxemia in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.72-76, 2001.
- PEIRÓ, J.R. *Aspectos clínico-laboratoriais e inflamatórios da injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) em equinos: efeitos da lidocaina*. 2002. 74f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- PEIRÓ, J.R.; CAMPEBELL, R.C.; SANTANA, A.F. et al. Clinical and laboratory evaluation after intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). *J. Equine Vet. Sci.*, v.19, p.185-189, 1999.
- 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, C.A.A. et al. Effects of diclofenac and dexamethasone on horse experimental endotoxemia. *Arq. Bras. Med. Vet Zootec.*, v.55, p.279-286, 2003.
- SCHOLER, D.W.; KU, E.C.; BOETTCHER, I. et al. Pharmacology of diclofenac sodium. *Am. J. Med.*, v.80, suppl 4B, p.34-38, 1986.
- SCHWARTZ, J.I.; CHAN, C.C.; MUKHOPADHYAN, S. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition by rofecoxib reverses naturally occurring fever in humans. *Clin. Pharmacol.*, v.65, p.653-660, 1999.
- SOUZA, G.E. P.; FERREIRA, S.H. Blockage by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions*, v.17, p.97-103, 1985.
- VALADÃO, C.A.A.; PEIRÓ, J.R.; SANTANA, A.E. et al. Evaluation of peritoneal fluid in horses with experimental endotoxemia. *J. Equine Vet. Sci.*, v.15, p.124-128, 1995.
- WAGNER, A.E.; COLLIN, I.D.; WERTZ, E.M. et al. Hemodynamic responses of horses to anesthesia and surgery, before and after administration of a low dose of endotoxin. *Vet. Surg.*, v.24, p.78-85, 1995.
- WARD, D.S.; FESSLER, J.F.; BOTTOMS, G.D. et al. Equine endotoxemia: cardiovascular, eicosanoid, hematologic, blood cervical, and plasma enzyme alterations. *Am. J. Vet. Res.*, v.48, p.1150-1156, 1987.