



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

ANTONIO AUGUSTO RODRIGUES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS E
DOSAGENS DE MEDIADORES BIOLÓGICOS EM CADELAS SUBMETIDAS
À OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE
SANGUE MEDULAR**

Recife
2014

ANTONIO AUGUSTO RODRIGUES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS E
DOSAGENS DE MEDIADORES BIOLÓGICOS EM CADELAS SUBMETIDAS
À OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE
SANGUE MEDULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho

Co-orientador: Prof. Dr. Rudson Almeida de Oliveira

Recife
2014

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS E
DOSAGENS DE MEDIADORES BIOLÓGICOS EM CADELAS SUBMETIDAS
À OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE
SANGUE MEDULAR**

Tese de Doutorado elaborada por
Antonio Augusto Rodrigues de Sousa

Aprovado em...../...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho
Orientadora (UFRPE)
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Prof. Dr. Rudson Almeida de Oliveira
Universidade Estadual do Maranhão

Prof^ª. Dra. Grazielle Anahy de Sousa Aleixo Cavalcanti
Universidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

Prof^ª. Dra. Lílian Sabrina Silvestre de Andrade
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Prof. Dr. Wagner McKalayton Alves de Sousa
Médico Veterinário

DEDICATÓRIA

A minha esposa Adriana Sousa, meus filhos Antonio Augusto e João Gabriel, aos meus pais Antonio Rodrigues de Sousa e Elzira Sousa *in memoriam*.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A professora Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho, pela oportunidade que me foi dada, confiança e consideração depositados em mim, durante esta longa jornada para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Pai superior, que me guiou e nunca me deixou fraquejar nesta longa caminhada.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco pela contribuição em melhorar minha formação profissional.

A Universidade Estadual do Maranhão pela minha formação profissional e apoio financeiro.

Ao Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual do Maranhão pela oportunidade em cooperar com o sucesso deste trabalho.

A professora Ana Maria Quessada, minha orientadora no mestrado na Universidade Federal do Piauí.

Aos professores Daniel Prazeres Chaves, José de Ribamar Silva Júnior por colaborarem nesta pesquisa.

Aos professores do curso de doutorado Marcos Antonio Lemos Oliveira, Paulo Fernandes de Lima, Francisco Feliciano da Silva e Áurea Wischral pelo aprendizado recebido.

Ao professor José Leite Machado por sua ajuda e incentivo quando sempre precisei e Doralina Duarte Costa.

Ao professor Adalberto Freire Borralho e Eliana Silva Simão pela amizade sincera.

Aos médicos veterinários Renan Fernandes do Nascimento Moraes, Vicente Ferrer Pinheiro Neto, Luiz Cláudio Costa Moraes, Eurival Medeiros Wanderley, Máximo Alberto Pestana Chaves e Rubens Rodrigues dos Santos pela amizade.

Ao colega Whaubtyfran Cabral Teixeira companheiro de convívio e grande incentivador por esta conquista.

Aos amigos Anthony DuderMilbourne, Safira Helena Monteiro Milbourne, Antonio Fernando de Souza, Maria de Jesus Sousa, VicentaMartinez Belaglovis, Dagmar Torres Machado e Anisete dos Santos Souza por serem sempre muito prestativos, sinceros e por poder contar sempre com eles em todos os momentos.

As senhoras Gercina Silva Ramos, Teresinha Borges de Pádua, Ilma Helena Serra Cerveira, pelo amor, dedicação e empenho em conseguir os animais para a realização dos procedimentos cirúrgicos desta pesquisa.

A Dineli Silva Brito, Maria Dalva Brito Viana Pereira, Marco Figueiredo Viana Pereira e Adriana Carvalho Gonçalves pela dedicação aos animais.

Aos funcionários Dalmo Rodrigues Teixeira sobrinho e afilhado, José Gomes de Almeida e Edna da Cruz Diniz por serem sempre muito prestativos sinceros e por poder contar com eles em todos os momentos.

TABELAS

Cytokines profile of female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy treated with autologous bone marrow.

Tabela 1 - Médias e desvio-padrão da interleucina IL-6, TNF- α e TGF- β 1 de cadelas submetidas à Osh. 24

Tabela 2 - Médias e desvio-padrão de mielograma em cadelas submetidas à Osh. 25

Avaliação dos níveis de cortisol em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia após aplicação de sangue medular autólogo.

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da temperatura retal de cadelas submetidas à Osh, distribuídos segundo grupos e momentos. 32

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão da frequência cardíaca de cadelas submetidas à Osh, distribuídos segundo grupos e momentos. 32

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão da frequência respiratória de cadelas submetidas à Osh, distribuídos segundo grupos e momentos. 32

Tabela 4 - Médias e desvios-padrão da dosagem de cortisol sérico de cadelas submetidas à Osh, distribuídos segundo grupos e momentos. 33

RESUMO

Objetivou-se avaliar a resposta inflamatória e a dor após a aplicação do sangue medular autólogo no pré-operatório de cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia, mensurando as citocinas interleucina-6, fator de necrose tumoral- α , fator de crescimento e transformação- β , mielograma, parâmetros fisiológicos e cortisol sérico. Para tanto, foram selecionadas 30 fêmeas da espécie canina, clinicamente híginas, de diferentes raças, com peso médio de 13,76 kg, selecionadas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Maranhão, distribuídas de forma igualitária e aleatória em três grupos: GI (Controle), GII (Convencional) e GIII (Experimental). No pré-operatório no GI fez-se analgesia com tramadol, GII penicilina benzatina 40.000/UI/kg e GIII tramadol e 10 mL de sangue medular autólogo coletado da metáfise proximal do úmero momentos antes da cirurgia e aplicados imediatamente no músculo bíceps femoral. Em todos os animais coletaram-se 5mL de sangue da veia cefálica para avaliação das citocinas no pré e pós-operatório nos momentos M_0 (antes da cirurgia) M_1 (6h após a cirurgia), M_2 (48h), M_3 (120h), M_4 (168h) e 0,5 mL de sangue para mielograma. Na (IL-6), verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre a menor média ($50,05 \pm 58,35$) do GIII e GII a maior média ($124,30 \pm 217,45$). Em (TNF- α), houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre o GIII com menor média ($40,53 \pm 44,03$) e GI com maior média ($99,94 \pm 113,63$). E (TGF- β_1), revelaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo experimental ($563,46 \pm 405,24$) e GII observou-se a menor média ($347,16 \pm 405,25$). O mielograma não apresentou diferenças em relação aos distintos procedimentos nos grupos. Quanto aos parâmetros fisiológicos não ocorreu diferença significativa entre os grupos, uma vez que todos os animais mantiveram os valores de referência; quanto aos níveis de cortisol se observou que o GIII apresentou resultados inferiores quando comparados com os demais grupos. Conclui-se que o sangue medular autólogo contribui com a recuperação cirúrgica de cadelas submetidas a ovariosalpingohisterectomia e a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias manteve-se equilibrada.

Palavras chaves: Citocinas, parâmetros fisiológicos, cortisol, tramadol.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the inflammatory and pain response after bone marrow application preoperatively in female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy, measuring the cytokines interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, transforming growth factor beta, myelogram, physiologic parameters and serum cortisol. Thirty female dogs, clinically healthy, from different breeds, with an average weight of 13,76 kg, from the veterinarian hospital of Universidade Estadual do Maranhão, distributed randomly and equally into three groups: GI (Control), GII (Conventional) e GIII (Experimental). GI received analgesia with tramadol, GII with benzatinpenicilina 40.000 UI/kg and GIII received tramadol plus 10 ml of autologous bone marrow, collected from humerus proximal metaphysis before the surgery, and applied on biceps femoris muscle. 5 ml of blood were collected for cytokines measurements, in five different times: M_0 (before surgery), M_1 (6 hours after surgery), M_2 (48 hours), M_3 (120 hours) and M_4 (168 hours). Samples with 0,5 ml of blood were collected for myelogram. Interleukin-6 showed different statistical significance between GIII lowest average and GII highest average. Tumor necrosis factor alpha evaluation showed significant difference between GIII and GI. Transforming growth factor beta analysis showed differences between GIII, with the lowest average on GII. The myelogram did not exhibited differences among groups. There were no differences relating to physiologic parameters. Regarding cortisol levels, the experimental group had inferior values comparing to the others. It is concluded that the bone marrow contributes to surgery recovery of dogs underwent ovariosalpingohysterectomy and that the pro and anti-inflammatory cytokine production remained balanced.

Keywords: Cytokine, physiologic parameters, cortisol, tramadol.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS	21
3.1	Cytokines profile of female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy treated with autologous bone marrow	21
3.2	Avaliação dos níveis de cortisol em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomiaapós aplicação de sangue medular autólogo	27
	REFERÊNCIAS	37
	ANEXO	41

1 INTRODUÇÃO

A superpopulação canina e felina é motivo de preocupação para o poder público e profissionais que trabalham na área de saúde. O potencial zoonótico que representa os cães e gatos sem domicílio, em especial os das zonas urbanas e nas periferias das cidades tem sido motivo de preocupação, principalmente por esses lugares, muitas vezes, não apresentarem saneamento básico necessário, o que pode facilitar a propagação de doenças principalmente as zoonoses: além disto, o descontrole reprodutivo pode acarretar um aumento demasiado de animais nas ruas com tendência cada vez mais a superpopulação.

Por outro lado, os tutores de animais estão mais informados sobre a necessidade de controle da população dos animais domésticos (MIGLIARI; DE VUONO, 2000; GOETHEN; SCHAEFERS-OKKENS; KIRPENSTEIJN, 2006), sendo a esterilização a mais indicada para controlar a natalidade de cães. Em vista disto, são empreendidos mutirões de castração para diminuir a população canina em várias cidades (MIGLIARI; DE VUONO, 2000).

Dentre os métodos de esterilização animal, a cirurgia é a mais utilizada para o controle populacional de animais, considerada também, a mais racional, porque evita o sacrifício em massa, realizado em vários países. Além disso, diminui os riscos de doenças que ocorrem com o uso indiscriminado de fármacos anticoncepcionais (GOETHEN; SCHAEFERS-OKKENS; KIRPENSTEIJN, 2006).

Nas cadelas, a esterilização cirúrgica é o mais usado e menos polêmico no controle reprodutivo. Sendo definitivo, seguro, eficiente e benéfico. Também é a mais indicada para a maioria dos animais criados com fins não reprodutivos, já que nesses casos o tutor solicita-o por não interessar-se na reprodução de seu animal (CONCANNON, 1997; HEDLUND, 2002).

Indicações importantes ainda incluem: correção de distocias, prevenção de tumores mamários, correção de estro prolongado, tratamento de cistos e tumores ovarianos, uterinos e vulvovaginais, doenças uterinas como metrite, piometra, subinvolução placentária, torção ou prolapso uterino e doenças vaginais como edema (BRADLEY, 1996; HARARI, 1999; STOCKLIN-GAUTSCH et al., 2001; HEDLUND, 2002).

São várias as técnicas cirúrgicas utilizadas para esterilização em cadelas, incluindo: ovariosalpingohisterectomia (OSH), histerectomia, salpingotripsia, salpingectomia, salpingohisterectomia (CONCANNON, 1997) e ovariectomia laparoscópica (NIMWEGEN; SWOL; KIRPENTEUN, 2005). No entanto, a mais realizada em clínicas particulares e hospitais universitários é a OSH (MIGLIARI; DE VUONO, 2000; DAVIDSON; MOLL; PAYTON, 2004).

A OSH pode ser realizada por celiotomia mediana pré-retroumbilical, técnica tradicional indicada por autores clássicos (FINGLAND, 1996; STONE; CANTRELL; SHARP, 1998; HEDLUND, 2002). Pode ainda ser pelo flanco (JANSSENS; JANSSENS, 1991; HANCOCK et al., 2005; HOWE, 2006) e por laparoscopia (DAVIDSON; MOLL; PAYTON, 2004; HANCOCK et al., 2005; MALM et al., 2005; NIMWEGEN; SWOL; KIRPENTEUN, 2005).

Esta pesquisa teve por objetivo estudar a resposta inflamatória utilizando protocolo terapêutico com sangue medular no pré-operatório para a realização de OSH em cadelas, comparando ao método tradicional, avaliando no pré e pós-operatório os parâmetros fisiológicos, cortisol sérico, citocinas Interleucina-6 (IL-6), Fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Fator de crescimento e transformação (TGF- β 1) e Mielograma.

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Maranhão (CEUA-UEMA-Parecer nº 025/2011).

O trabalho foi escrito em forma de artigo, o primeiro de acordo com as normas da Revista Veterinary Surgery e o segundo Ciência Rural.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A hematopoiese ou hemopoiese (hemato ou hemo = sangue, poiese = fazer) é realizada no sistema hematopoiético, o qual é constituído por células-tronco hematopoiéticas (CTH), células precursoras, células sanguíneas morfofuncionais maduras e tecidas de sustentação da hematopoiese, localizado nas cavidades medulares dos ossos longos, chatos, baço, fígado, linfonodos e timo (GASPER, 2000).

O desenvolvimento do sistema vascular e hematopoiético se inicia na fase precoce da vida embrionária e continua no feto podendo ser dividida em três períodos distintos: mesoblástico, hepático e mielóide (GASPER, 2000).

A medula óssea tem como principal função a hematopoeise de células eritróides, granulocíticas, megacariocíticas e linfocitárias (RASKIN, 1998).

A coleta de medula óssea (MO) é conduzida visando à obtenção de sangue para realização de mielograma, indicado em situações bem precisas. Este consiste no exame direto das células da MO colhidas por punção aspirativa, permitindo verificar anormalidade da produção sanguínea, as alterações no aspecto celular e a presença de células neoplásicas (AQUINO et al., 2002).

Geralmente é solicitado quando se encontram alterações, como neutropenia persistente, trombocitopenia, leucocitose, morfologia anormal de células sanguíneas, presença inexplicável de células imaturas no sangue, anemia arregenerativa ou a combinação de ambas as enfermidades (GALE et al., 1981; GOSSET, 2000). Também podem ser utilizados após um quadro de Hiperproteinemia, quando há suspeita de mieloma múltiplo, alguns casos de linfoma, leishmaniose, brucelose, erliquiose e doenças sistêmicas de origem fúngica, entre outras (AQUINO et al., 2002). Pode-se ainda indicar a causa de hipercalcemia quando associada com neoplasmas (OLIVEIRA, 2008).

O mielograma é indispensável para o diagnóstico e a classificação das leucemias mielóides e linfóides agudas. Nessa doença, um grande número de células tumorais, chamadas blastos, é encontrado no interior da medula óssea (LUND, 2000; LARUE; POWERS; WITHROW, 2005).

Os principais distúrbios mieloproliferativos estão relacionados ao aumento da celularidade das linhagens mielóides ou eritróides podendo estar diretamente ligados com a resposta à perda sanguínea e destruição celular. Elevações no número de células são exemplos de anormalidades proliferativas em que o mielograma está indicado e incluem policitemia, leucocitose ou trombocitose persistentes. Existem várias condições secundárias resultante da policitemia, como, a hipóxia, desidratação, neoplasias, hipertiroidismo ou contração esplênica (THRALL, 2007).

Contudo, para a obtenção de células hematopoiéticas, é necessária a aspiração da medula, utilizando-se agulhas específicas em locais onde se obtém maior quantidade desse material. Geralmente, as punções ocorrem na crista ilíaca, trocanter maior do fêmur e epífise proximal do úmero. O material deve ser coletado em condições

assépticas, com o paciente sob anestesia geral, utilizando seringas contendo anticoagulantes ou não (RASKIN, 1998).

A elevação de qualquer linha leucocitária sem doença inflamatória aparente é também um fator indicativo para avaliação da medula. O aumento do número de plaquetas pode ser secundário à perda crônica de sangue, inflamação crônica, esplenectomia, síndrome de “*Cushing*” e diabetes *mellitus*. Entretanto, uma trombocitose pode ser resultado de uma neoplasia da linhagem plaquetária e o exame da medula óssea tornam-se necessário (THRALL, 2007).

A hemorragia é uma preocupação teórica mesmo em animais trombocitopênicos. As infecções iatrogênicas são possíveis, mas o risco é mínimo, especialmente se a pele da área pela qual é realizado o aspirado estiver adequadamente preparada (GRINDEM; NEEL; JUOPPERI, 2002).

A crescente abordagem das células-tronco na área científica e na mídia pelos resultados apresentados tem ocorrido devido à capacidade de reconstituição hematopoiética, importante na reparação tecidual devido às ações mitogênicas, quimiotáticas e neovasculares, após a ativação por agentes farmacológicos ou fisiológicos (HERZOG; CHAI; KRAUSE, 2003).

Um estudo foi realizado para avaliar o potencial das células derivadas da medula óssea autóloga em comparação com creme leucocitário de sangue autólogo para uma rápida cicatrização de feridas cutâneas em coelhos. Concluindo que a aplicação de derivados da medula óssea em células nucleadas das margens da ferida resultou em início mais rápido e de forma significativa de cura completa em comparação com o creme leucocitário de sangue autólogo e plasma autólogo (AKELA et al., 2012).

Já encontrar um material biológico ideal para tratar os grandes defeitos ósseos, continua a ser um desafio para os cirurgiões e pesquisadores ortopédicos. Vários estudos têm sido realizados sobre o tema da regeneração óssea, cada uma com suas próprias vantagens (HOBENAGHI et al., 2014).

Citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de célula no local da lesão e por células do sistema imunológico que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios. Diferentes dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas, porém, atuam

especialmente por mecanismos autócrino (age no local onde são produzidas), parácrino (células vizinhas) e endócrinas secretadas para circulação (com efeitos à distância) (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; SOMMER; WHITE, 2010).

Vários tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As citocinas são redundantes em suas atividades, ocasionando ações semelhantes desencadeadas por diferentes citocinas. Assim, frequentemente, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (ZHANG, 2007).

Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias Th1) as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7, 8, TNF- α e IFN- γ , ou atenuar (anti-inflamatórias Th2) as (IL)4, 10, 13 e TGF- β , de acordo com o microambiente no qual estão localizadas (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; ROIT; BROSTOFF; MALE, 2004; SOMMER; WHITE, 2010).

As citocinas são mediadoras necessárias para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Após as lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas Th1 principalmente IFN- γ contribui para lesões em órgão, levando à insuficiência múltipla dos órgãos, choque séptico e à morte. As citocinas Th2 podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; TIZARD, 2002; SOMMER; WHITE, 2010).

Portanto, não sendo possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas agrupam-se em interleucinas, numeradas sequencialmente de (IL-1 a IL-35, TNF- α e IFN- γ), quimiocinas, interferons e fatores de crescimento mesenquimal (SOMMER; WHITE, 2010; RAEBURN et al., 2002).

Originalmente chamadas de linfocinas ou monocinas para indicar sua fonte celular, tornou-se claro que o termo citocina é a melhor descrição, pois, todas as células nucleadas são capazes de sintetizar estas proteínas e também responder a elas. A

maioria das citocinas está primariamente envolvida na resposta do hospedeiro a infecções ou doenças e menos comumente com os mecanismos homeostáticos. Elas são chamadas citocinas anti-inflamatórias pela sua capacidade de suprimir os genes para citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, TNF- α e as quimiocinas (VOLTARELLI, 1994; DINARELLO, 2000; VARELLA; FORTE, 2001).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imune-antígeno específico e reações inflamatórias, sendo um dos principais mediadores da fase aguda da inflamação. Estimula a produção de proteínas na fase aguda da inflamação nos hepatócitos e aumenta a concentração de zinco intracelular nestas células o que, teoricamente, previne a toxicidade causada pelo tetracloreto de metila. Tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (KATO et al., 1997).

A IL-6 é uma glicoproteína de 22 a 27 kDa, secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e células da glia, sendo TNF- α e IL-1 potentes indutores. Causa febre e ativa o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, usando os receptores α (IL-6R α) e a subunidade gp130 (glicoproteína 130, membros da superfamília de receptor de citocina de classe I). Tem relação estrutural com IL-4, fator inibidor de leucemia, eritropoietina e fator neurotrófico ciliar (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; SOMMER; WHITE, 2010).

A IL-6 é um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, operação e queimadura. Após lesão, concentrações plasmáticas são detectáveis em 60 minutos, com pico entre quatro e seis horas, podendo persistir por 10 dias. É considerado o marcador mais relevante do grau de lesão tecidual durante um procedimento cirúrgico, em que o aumento excessivo e prolongado está associado a uma morbidade pós-operatória maior (KATO et al., 1997; LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; GEBHARD et al., 2000).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células destruidoras naturais. Além disso, ativa astrócitos e micróglia, e ainda regula a expressão de neuropeptídeos após lesão neuronal, contribuindo para sua regeneração. Contudo, também exerce propriedades antiinflamatórias durante a lesão,

por liberar receptores solúveis de TNF- α (CURFS; MIES; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; RAEBURN et al., 2002).

TNF- α apresenta uma função crítica na resistência dos hospedeiros a infecções e crescimento de tumores malignos, agindo como imunoestimulantes e também como mediadores da resposta inflamatória. Muitas das ações produzidas pelo TNF- α são funcionalmente semelhantes a da IL-1. Por outro lado, um excesso na produção de TNF- α , tem sido relacionado com várias condições patológicas, que incluem caquexia, choque séptico causado por infecção bacteriana gram negativas, doenças auto-imunes e septicemia meningocócica (EIGLER et al., 1997; WOLF et al., 2002).

O TNF- α tem sido chamado de citocina sentinela, uma vez que inicia a defesa no local da lesão, ativando outras citocinas e fatores tróficos. Ela pode ser liberada por diversas células, inclusive as de Schwann, e exercer seus efeitos através da interação com o receptor do TNF- α tipo I (STNRF1), que tem sua expressão aumentada após a lesão neuronal (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006).

A principal atividade biológica do TNF- α é uma acentuada citólise e citoestase em diferentes linhagens celulares, tendo ação antitumoral importantíssima. Sendo o principal mediador na caquexia das neoplasias malignas (VARELLA; FORTE, 2001;).

Altas concentrações de TNF- α no sangue de pacientes com septicemias correlacionam-se com a piora do prognóstico (KUNKEL et al., 1991). Em animais de laboratório, injeções de TNF- α mesmo na ausência de bactérias, levam a quadro semelhante ao choque séptico, sugerindo uma importante ação deletéria quando sintetizado em quantidades excessivas (KUNKEL et al., 1991; SCHAFERS et al., 2003).

TGF- β compreende cinco isoformas diferentes: TGF- β 1 a β 5. Sinalizam por meio dos mesmos receptores de superfície celular e possuem semelhantes alvos celulares, que são as plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células T e B, com importante papel na resposta imune, regulando o desenvolvimento das células T, suprimindo a produção de citocinas, antagonizando os efeitos de Interferon-gama (IFN- γ) suprimindo as atividades de Th1 (CURFS; MIES; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; TIZARD, 2002; ZHANG, 2007).

TGF- β têm sido mostrados para desempenhar um papel chave na reparação do tecido danificado. A capacidade da ferida para estimular a produção de TGF- β pode ser detectada tão cedo quanto o do primeiro até ao sétimo dia após o ferimento (YONGBO et al., 2006).

A temperatura corporal normal em cães apresenta variações de 37,9 a 39,9°C (DROBERTSHAAW, 2006). A frequência cardíaca em cães saudáveis pode variar entre 70 a 120 batimentos por minuto (ERICKSON; DETWEILER, 2006). A frequência respiratória normal da espécie canina varia de 20 a 34 movimentos respiratórios por minuto (REECE, 2006).

A dor causa várias interferências nos eixos neuroendócrinos com aumento nos níveis de aldosterona, causando retenção de sódio e desequilíbrio hidroeletrólítico, aumento de cortisol, que induz hiperglicemia e liberação de catecolaminas, desencadeadoras de alterações cardíacas como arritmias e aumento no consumo de oxigênio pelo miocárdio (CAMARGO; FUTEMA; BECHARA, 2007).

A avaliação da eficácia analgésica dos fármacos vem sendo demonstrada a partir de alterações fisiológicas. Dentre os hormônios hipofisários, o adrenocorticotrópico (ACTH) estimula a secreção de corticosteróides em condições de stress. O cortisol é um parâmetro preciso e consistente para avaliação da resposta neuroendócrina ao estresse cirúrgico, indicando a presença de dor (MALM, et al., 2005). A mensuração sérica de cortisol mostrou-se interessante em vários estudos, uma vez que esta variável clínica tende a apresentar incrementos significativos, decorrentes do procedimento cirúrgico e principalmente da dor pós-operatória (FOX et al., 1998; KO et al., 2000). A elevação do cortisol determina ainda aumento da gliconeogênese hepática e hiperglicemia (BREAZILE, 1987; LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000). Assim, a mensuração da glicemia permite identificar momentos de maior estresse fisiológico facilitando, em conjunto com a avaliação do cortisol sérico, estudar a eficácia analgésica de fármacos.

Os valores normais do cortisol em cães variam de 0,5 – 6,0 $\mu\text{g/dl}$ (FELDMAN; NELSON, 1985). Vários fatores podem levar ao aumento do cortisol, dentre os quais destacamos cirurgia e anestesia, sendo um parâmetro preciso e consistente para avaliação da resposta neuroendócrina ao estresse cirúrgico, indicando a

presença da dor, que comumente é usado em cães após OSH (FOX et al., 1998; KO et al., 2000; MALM et al., 2005; CALDEIRA et al., 2006).

O cloridrato de tramadol é um analgésico opióide de ação central que estimula a liberação de serotonina, inibi a recaptação deste neurotransmissor e de noradrenalina, além de apresentar moderada afinidade pelo receptor opióide μ (ULICH et al., 1991; LEE; MCTAVISH; SORKIN, 1993; RAFFA et al., 1993).

Os mecanismos não opióides deste fármaco podem potencializar a analgesia, sem acarretar depressão respiratória e cardíaca como é observado com outros opióides (SAWYER et al., 1982; ETCHES; SANDLER; DALEY, 1989; VICKERES et al., 1992; BARAKA et al., 1993; HASKINS, 2001; LUNA, 2002; CORTOPASSI, 2002).

Este analgésico tem eficácia similar à morfina para uso humano, efeito similar ocorre em cães (VICKERES et al., 1992; BARAKA, et al., 1993; MASTROCINQUE; FANTONI, 2003).

O maleato de acepromazina é um fenotiazínico, droga de uso frequente na rotina pré-anestésica na Medicina Veterinária, tanto por seu efeito tranquilizante, quanto pela potencialização de agentes anestésicos, barbitúricos, não-barbitúricos e dissociativos. Produz depressão do sistema nervoso central devido à sua ação sobre os centros nervosos inferiores, tálamo, hipotálamo e formação reticular. Apresentam propriedades antieméticas, anti-histamínicas, antiespasmódicas e, principalmente adrenolíticas (SHORT, 1987; FANTONI, 2002).

O cloridrato de quetamina é um anestésico geral dissociativo empregado em Medicina Veterinária (LIN, 1996; VALADÃO, 2002). Seu mecanismo de ação ainda não é bem definido, porém pode bloquear os receptores muscarínicos dos neurônios centrais até inibirem a recaptação das catecolaminas. Sua atividade analgésica é atribuída à inibição da condução de impulsos dolorosos ao tálamo e áreas corticais (VALADÃO, 2002).

Geralmente, a quetamina é usada em associações a outros agentes, para minimização dos seus efeitos catalépticos e alucinógenos. Dentre os fármacos utilizados, destacam-se os benzodiazepínicos, por sua ação relaxante muscular, exibem ainda efeitos ansiolíticos, tranquilizantes, hipnóticos e provocam amnésia e alterações

psicomotoras, sendo desprovidos de efeitos adversos nas doses habituais (LIN, 1996; VALADÃO, 2002).

O sevoflurano embora tenha um baixo coeficiente de solubilidade no sangue e gás, proporciona indução e recuperação mais rápida que outros agentes inalatórios em uso (HIKASA, et al., 1995). O sevoflurano tende ainda a preservar o débito cardíaco, nas concentrações utilizadas na prática clínico-cirúrgica. Em concentrações mais elevadas, foi observada redução dessa variável (BERNARD et al., 1990), promovendo ainda diminuição progressiva da pressão sanguínea, de maneira semelhante ao que ocorre com os demais anestésicos voláteis (EBERT, 1996; LOWE; HETTRICK; PAGEL, 1996).

O fármaco promove uma diminuição da contractilidade do miocárdio, a exemplo do que ocorre com o isoflurano e o desflurano, e não potencializa as arritmias cardíacas induzidas pela adrenalina (EBERT, 1996). Assim, o sevoflurano, e, o isoflurano, não proporciona alterações no sistema de condução cardíaca, sendo importante na estabilidade do ritmo cardíaco durante a anestesia (NAKAIGAWA et al., 1995).

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Cytokine profile of dogs undergoing OSH

Cytokine profile of female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy treated with autologous bone marrow

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to assess the cytokine profile of female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy using autologous bone marrow.

Study design: descriptive report

Animals: 30 animals

Methods: Physiological parameters were analyzed, as were the cytokines IL-6, TNF- α , TGF- β and bone marrow. 30 clinically healthy adult females were recruited, with a mean weight of 13.76 kg and an indication for sterilization. The animals were randomly divided into three groups: GI (control); GII (conventional) and GIII (experimental). In order to assess the cytokines pre and post-operatory, 5 ml of blood was collected at moments M₀ (before surgery) M₁ (six hours after surgery), M₂ (48 h), M₃ (120 h), M₄ (168 h). In addition, 0.5 ml of bone marrow was collected using a myelogram.

Results: The results showed that IL-6 exhibited a significant difference between the lowest average (50.05 ± 58.35) in the experimental group and the highest average (124.30 ± 217.45) in the conventional group. In the analysis of TNF- α , there was only a significant difference between the experimental group with the lowest average (40.53 ± 44.03) and the control group with the highest average (113.63 ± 99.94). With regards to TGF- β 1, a significant difference was found between the experimental group (563.46 ± 405.24) and the conventional group in terms of the lowest average (347.16 ± 405.25). The myelogram showed no differences between the groups analyzed.

Conclusions: Thus, the intramuscular application of autologous bone marrow could be a therapeutic option for female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy.

INTRODUCTION

Animal overpopulation is a concern to both government and health professionals. The presence of errant dogs and cats is a concern, especially in urban and peripheral areas, since these places often do not have appropriate sanitation, which can facilitate the spread of diseases and zoonosis¹.

On the other hand, owners are more informed about the need for population control, and sterilization has become the preferable birth control method for dogs. Surgery is the most common method of animal sterilization and is also considered the most rational, since it avoids the mass sacrifice performed in several countries. It also decreases the risk of diseases that occur with the indiscriminate use of contraceptive drugs¹.

In female dogs, surgical sterilization is the most widely used and least controversial method of reproductive control. It is definite, safe, efficient and benefic. It is also the most suitable for the majority of animals raised for non-reproductive purposes². In veterinary practice, drugs for pain and inflammation management are administered after this kind of procedure. Therefore, the aim of the present study was to assess the cytokine profile in female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy using autologous bone marrow and tramadol.

MATERIALS AND METHODS

The present study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA/UEMA) under protocol number 025/2011. After receiving prior authorization from the owners, 30 clinically healthy adult female dogs of different races were selected from the serial cases of the Veterinary Hospital of the State University of Maranhão.

The animals were randomly divided into three groups: the control group (GI), which received analgesia with tramadol; the conventional group (GII), which received benzathine penicillin (40.000UI/kg) and the experimental group (GIII), which received tramadol plus 10 ml of bone marrow, collected from the proximal metaphysis of the humerus and immediately applied into the biceps femoris muscle.

A physical examination was performed before the surgical procedure to measure the rectal temperature, heart rate and respiratory rate. A clinical examination was also

performed to measure the blood count and search for hemoparasites. The indirect immunofluorescence assay (IFA) was used to assess leishmaniasis.

The analysis of the cytokines interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and transforming growth factor (TGF- β 1) was performed using ELISA. For this purpose, 5 ml of blood was collected from the cephalic vein at five different moments: M₀ (preoperative); M₁ (6 hours after surgery); M₂ (48 hours after surgery); M₃ (120 hours after surgery) and M₄ (168 hours after surgery).

For the myelogram, 0.5 ml of bone marrow was collected, stretched on eight slides (four slides from M₀ and four from M₄) and stained with Giemsa. This enabled a comparison of the granulocyte, erythroid and myeloid proportions.

All animals underwent the same anesthetic protocol, using 1% acepromazine as a premedication (0.1 mg/kg) and an intravenous combination of ketamine (5 mg/kg) and diazepam (0.5 mg/kg) for anesthetic induction. The animals were intubated using sevoflurane diluted in 100% oxygen.

The animals were kept in venoclysis with the administration of Ringer's lactate solution (10 ml/ kg/hour during the intra-operative and post-operative period) until the return of the physiological parameters and anesthesia. The traditional surgical technique was adopted in all groups.

Post-operatively, the animals were kept in appropriate individual cages where they received water and a commercial diet *ad libitum*, with daily cleaning of the wound with sodium chloride 0.9% for seven days. They were given back to their tutors immediately after the point's removal.

Data were tabulated and submitted to ANOVA, followed by the Student-Newman-Keuls test (SNK) to compare the means of different observation times within the same group and between groups, considering a significance level of 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

The results of the analysis of cytokines showed that serum IL-6 exhibited a significant difference between the lowest average in the experimental group (GIII) and the highest average in the conventional group (GII) (Table 1).

However, when performing the analysis considering the five different times, there were no significant differences between groups. There was also a statistical

difference between the same cytokine in the experimental group, where M₁ had a higher mean value in relation to the other moments, with the exception of M₄.

When analyzing TNF- α serum, significant differences were only found between GIII, with the lowest average (40.53 ± 44.03), and GI, with the highest average (113.63 ± 99.94). No significant differences were observed in relation to the moments.

The levels of TGF- β 1 revealed significant differences between the experimental group and the conventional group, which also produced the lowest average. In the analysis between moments, there were only significant differences in GII, where M₀ was lower than all the other moments (Table 1).

Table 1. Mean and standard deviation of measurements of IL-6, TNF- α and TGF- β 1 in female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy

		MOMENTS					MÉAN \pm S. D	Min. Value	Max. Value
		M ₀	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄			
IL-6	GI	89,03 ^{Aa} \pm 126,30	125,23 ^{Aa} \pm 90,25	132,29 ^{Aa} \pm 161,23	62,75 ^{Aa} \pm 91,65	76,25 ^{Aa} \pm 92,97	96,85 ^{AB} \pm 114,45	0	494,33
	GII	150,40 ^{Aa} \pm 309,62	230,62 ^{Aa} \pm 303,47	113,19 ^{Aa} \pm 183,87	66,48 ^{Aa} \pm 65,37	52,54 ^{Aa} \pm 51,26	124,30 ^B \pm 217,45	0	1049,88
	GIII	31,86 ^{Aa} \pm 57,01	104,50 ^{Ab} \pm 72,20	31,36 ^{Aa} \pm 44,72	37,56 ^{Aa} \pm 44,10	45,81 ^{Ab} \pm 43,13	50,05 ^A \pm 58,35	0	210,00
TNF- α	GI	77,74 ^{Aa} \pm 70,10	96,20 ^{Aa} \pm 98,73	136,90 ^{Aa} \pm 165,91	102,32 ^{Aa} \pm 108,18	84,77 ^{Aa} \pm 119,95	99,94 ^A \pm 113,63	0	527,22
	GII	67,93 ^{Aa} \pm 61,82	63,26 ^{Aa} \pm 47,97	139,40 ^{Aa} \pm 229,90	54,93 ^{Aa} \pm 47,11	33,79 ^{Aa} \pm 25,51	72,28 ^{AB} \pm 112,56	5.000	774,33
	GIII	49,73 ^{Aa} \pm 62,36	33,46 ^{Aa} \pm 52,64	36,21 ^{Aa} \pm 47,04	36,74 ^{Aa} \pm 29,00	47,61 ^{Aa} \pm 26,24	40,53 ^B \pm 44,03	0	171,22
TGF- β 1	GI	701,52 ^{Aa} \pm 331,68	552,87 ^{Aa} \pm 179,88	482,22 ^{Aa} \pm 274,51	474,00 ^{Aa} \pm 376,41	726,23 ^{Aa} \pm 352,05	576,33 ^A \pm 318,13	0	1237,50
	GII	119,90 ^{Ab} \pm 306,85	339,26 ^{Aa} \pm 441,83	606,86 ^{Aa} \pm 449,37	225,93 ^{Aa} \pm 185,64	468,09 ^{Aa} \pm 503,09	347,16 ^B \pm 405,25	0	1556,25
	GIII	799,02 ^{Aa} \pm 400,95	555,73 ^{Aa} \pm 387,76	527,50 ^{Aa} \pm 294,24	610,19 ^{Aa} \pm 525,07	293,14 ^{Aa} \pm 40,02	563,46 ^A \pm 405,24	0	1546,00

Averages presented without data transformation. To perform the analysis of variance were transformed by square root of x. Mean (\pm SD) followed by same letters in lowercase and uppercase line in column do not differ by SNK $p > 0.05$. Test for Normality of errors: Kolmogorov-Smirnov: D = 0.09, P = 0.089.

The myelogram analysis revealed no statistically significant differences in the variables studied, either between groups or moments (Table 2).

Table 2. Mean and standard deviation of the myelogram in dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy: granulocytic, erythrocyte and myeloid series

Moments	GI	GII	GIII
M ₀ Granulocytic series	51,80±7,03 ^{Aa}	54,60±4,84 ^{Aa}	48,80±7,60 ^{Aa}
M ₀ Erythrocytic series	39,30±4,7 ^{Aa}	40,10±5,04 ^{Aa}	37,30±5,90 ^{Aa}
M ₀ Myeloid proportion	1,35±0,34 ^{Aa}	1,24±0,25 ^{Aa}	1,52±0,45 ^{Aa}
M ₄ Granulocytic series	55,30±5,01 ^{Aa}	60,30±6,27 ^{Aa}	60,30±5,39 ^{Aa}
M ₄ Erythrocytic series	35,90±5,10 ^{Aa}	34,40±4,00 ^{Aa}	32,60±3,23 ^{Aa}
M ₄ Myeloid proportion	1,57±0,3 ^{Aa}	1,79±0,36 ^{Aa}	1,87±0,30 ^{Aa}
Overall average(Gs)	53,55±6,25	54,55±8,03	57,45±7,05
Overall average(Es)	37,60±5,09	37,25±5,31	34,95±5,22
Overall average(Mp)	1,46±0,34	1,51±0,41	1,70±0,41

Means followed by different letters, capital letters in the same row and lowercase in the same column, different by SNK test at 5% significance between groups and same parameter respectively.

DISCUSSION

The lowest rates observed in the levels of IL-6 and TNF- α in the experimental group showed that there was a decrease in the inflammatory reaction, which is common in surgical procedures, even considering the doses of tramadol and bone marrow used to stimulate the synthesis of opioid receptors. These were able to prevent the elevation of IL-6 and TNF- α , except in the conventional group, without delaying the healing process, which occurred normally in all groups^{3,4}.

With regards to the dosages of TGF- β 1, there was a similarity between the experimental and control groups, demonstrating that the healing process occurred satisfactorily. Furthermore, this cytokine may also have decreased the level of cytotoxicity produced by T cells, thereby reducing the expression of other cytokines or their production^{5,6}.

In the present work, bone marrow plays a role as immune modulator since it is capable to produce several kinds of cytokines and growth factors, which contribute in the healing process as is described by⁷. In Veterinary Medicine, autologous bone marrow transplantation has been used mainly in wound healing⁸ and bone repair⁹.

CONCLUSIONS

The autologous bone marrow used in animals can be applied immediately before the animals are submitted to ovariosalpingohysterectomy (OSH).

Pro and anti-inflammatory cytokines exhibited balanced actions during the ovariosalpingohysterectomy of female dogs.

REFERENCES

- ¹Goethen DS, Schaefers-Okkens, A, Kirpensteijn J. Marking a rational choice between ovariectomy and ovariohysterectomy in the dog: a discussion of the benefits of effects. **Vet Surg** 2006; 35:136-143
- ²Concannon WP: **Endocrinologia reprodutiva, contracepção e terminação da gestação em cães**, in: Ettinger JS, Feldman CE (eds): Tratado de medicina interna veterinária (ed 4). São Paulo, Manole, 1997, pp. 2242-2247
- ³Ulich, TR, Del Castillo J, Mcniece IK, et al: Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) or granulocyte-macrophage CSF synergistically increases granulopoiesis in vivo. **Blood** 1991, 78:1954-1962
- ⁴Lee CR, Mctavish D, Sorkin EM. Tramadol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. **Drugs** 1993; 46:313-340
- ⁵Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje, JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev** 1997; 10:742-780
- ⁶Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin** 2007; 45:27-37
- ⁷Yongbo L, Deborah S, Dulchavsky PA, et al: Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. **J Surg Res** 2006; 136:336-41
- ⁸Akela A, Nandi SK, Banerjee D, et al: Evaluation of autologous bone marrow in wound healing in animal model: a possible application of autologous stem cells. **Int Wound J** 2012; 9:505-516
- ⁹Hobbenaghi R, Mahboob P, Saifzadeh S, et al: Histopathological features of bone regeneration in a canine segmental ulnar defect model. **Diagn Pathol** 2014; 9:59

3.2 Avaliação dos níveis de cortisol em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia após aplicação de sangue medular autólogo

Evaluation of cortisol levels in female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy after application of autologous bone marrow

RESUMO

Objetivou-se neste estudo avaliar os níveis de cortisol em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia após o uso de sangue medular no pré-operatório. Utilizou-se 30 fêmeas adultas, clinicamente saudáveis, distribuídas de forma aleatória em três grupos: GI (Controle), GII (Convencional) e GIII (Experimental). Foram mensuradas a temperatura retal (TR), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e dosagem do cortisol sérico (CS) em cinco momentos: M_0 (pré-operatório), M_1 (seis horas após a cirurgia), M_2 (48 h), M_3 (120 h) e M_4 (168 h). No grupo experimental foram coletados de cada animal 10 mL de medula óssea da metáfise proximal do úmero, momentos antes da cirurgia, e aplicado imediatamente no músculo bíceps femoral. As variáveis TR, CF e FR apresentaram comportamento semelhante. As médias da variável CS apresentaram diferenças significativas entre os grupos e entre os momentos dentro dos grupos, a média geral foi maior em GII. Nos momentos M_1 GII foi o que apresentou a maior média nos três grupos. Desta forma, verificou-se que o uso da medula óssea no pré-operatório não alterou as variáveis fisiológicas, podendo ser usada como alternativa terapêutica na reparação tecidual de ovariosalpingohisterectomia em cadelas.

Palavras-chave: canino, castração, células do sangue, cortisol, parâmetros.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the levels of cortisol in female dogs undergoing ovariosalpingohysterectomy after the use of bone marrow preoperatively. 30 clinically healthy adult dogs were used, randomly divided into three groups: GI (control), GII (conventional) and GIII (experimental). Rectal temperature (RT), heart rate (HR), respiratory rate (RR) and serum cortisol (CS) were measured at five moments: M0 (preoperative), M1 (six hours after surgery), M2 (48 h), M3 (120 h) and M4 (168 h). In the experimental group were collected from each animal 10 mL of bone marrow from the proximal metaphysis of the humerus moments before surgery, and immediately applied in the biceps femoris muscle. The TR, CF and RF variables have similar behavior. The mean CS variable showed significant differences between groups and between moments within groups, the overall mean was higher in GII. At M1, GII presented the highest average in the three groups. That way, it was found that the use of bone marrow preoperatively did not affect the physiological variables and can be used as an alternative therapy in wound healing ovariosalpingohysterectomy in female dogs.

Key words: bone marrow, canine, castration, cortisol.

INTRODUÇÃO

O uso de células sanguíneas no tratamento de doenças tem sido amplamente discutido na área científica e na mídia. Os efeitos terapêuticos do sangue têm sido atribuídos em parte às plaquetas, que chegam rapidamente ao local da ferida e liberam múltiplos fatores de crescimento (FCs) e citocinas importante na reparação tecidual devido às ações mitogênicas, quimiotáxicas e neovasculares, após a ativação por agentes farmacológicos ou fisiológicos (HERZOG et al., 2003).

Por outro lado, a preocupação das interações destas células com as variáveis fisiológicas durante as cirurgias ainda necessitam de mais estudos, haja vista, que estas, pelo seu potencial de diferenciação e diminuição do processo inflamatório podem melhorar sobre maneira o processo de cicatrização, atuando como coadjuvantes da analgesia pós-operatória (ETCHES et al., 1989; SAWYER et al., 1992; VICKERS et al., 1992; BARAKA et al., 1993).

Em cadelas, a esterilização cirúrgica é o método mais prático e menos polêmico de controle reprodutivo. É definitivo, seguro, eficiente e proporciona efeitos benéficos. É o método mais indicado para a maioria dos animais criados com fins não reprodutivos (CONCANNON, 1997). A ovariosalpingohisterectomia OSH é a cirurgia eletiva mais realizada em clínicas particulares e hospitais universitários (CONCANNON, 1997; HOWE, 2006).

São várias as técnicas cirúrgicas utilizadas para esterilização em cadelas, incluindo OSH por incisão mediana pré-retroumbilical e laparoscópica (DAVIDSON et al., 2004; HANCOCK et al., 2005; MALM et al., 2005; HOWE, 2006). Durante a realização da OSH podem ocorrer complicações anestésicas reversíveis, como acidose respiratória, onde os sinais clínicos mais comuns em cães anestesiados são o aumento da frequência respiratória, tremores musculares e taquicardia, complicações que podem ser evitadas pelo uso de substâncias eletrolíticas alcalinizantes e oxigênio durante o trans e pós-operatório imediato (HASKINS, 2001; CORTOPASSI, 2002; LUNA, 2002).

Situações estressantes e dolorosas podem alterar a secreção dos hormônios hipofisários que regulam diretamente as funções relacionadas ao bem-estar do animal como reprodução, crescimento e resistência imunológica. Dentre os hormônios hipofisários, o adrenocortitrópico (ACTH) estimula a secreção e liberação de glicocorticóides no sangue em condições de estresse (FOX et al., 1998).

O objetivo deste estudo foi avaliar o uso da aplicação de sangue medular autólogo no pré-operatório de cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia com avaliação do cortisol sérico durante o pré e pós-operatório e dos parâmetros fisiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Após autorização dos proprietários, foram selecionadas 30 fêmeas adultas da espécie canina, clinicamente híidas, provenientes da casuística do Hospital Veterinário Universitário. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: GI (Controle), GII (Convencional) e GIII (Experimental). Foi realizado previamente exame físico, com mensuração da temperatura retal (TR), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR); e exame clínico, com hemograma, pesquisa de hemoparasitos (*Babesia canis*, *Ehrlichiaspp.*) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose.

A dosagem do cortisol sérico (CS) foi realizada pela técnica de quimiluminescência, em cinco momentos: M₀ (antes da realização de quaisquer procedimentos cirúrgicos), M₁ (seis horas após a cirurgia), M₂ (48h), M₃ (120h) e M₄ (168h).

Como medicação pré-anestésica foi utilizado em todos os animais maleato de acepromazinaa 1% na dose de 0,1mg/kg, via endovenosa. No GI e GIII, utilizou-se analgesia preemptiva com cloridrato de tramadol na dose de 2mg/kg, via endovenosa e no GII quimioprofilaxia antibiótica com penicilina benzatina na dose de 40.000UI/kg, via intramuscular.

Para indução anestésica, foi utilizada quetamina (5mg/kg) associada ao diazepam (0,5mg/kg), via intravenosa, e em seguida procedeu-se à intubação dos animais, que foram mantidos em plano cirúrgico com sevoflurano diluído em 100% de oxigênio, em circuito semi-fechado. No grupo controle, momentos antes da cirurgia, foram coletados 10 ml de medula óssea de cada animal, da metáfise proximal do úmero, e aplicada imediatamente no músculo bíceps femoral.

Os animais foram mantidos em venoclise com a administração de solução de Ringer com lactato, 10 ml/kg/hora durante o trans e pós-operatório até o retorno dos parâmetros fisiológicos e da anestesia. A técnica cirúrgica adotada para a OSH foi a tradicional em todos os grupos (HEDLUND, 2002).

No pós-operatório os animais foram mantidos em canis individuais apropriados, recebendo água e ração comercial *ad libitum*, procedeu-se higienização diária da ferida cirúrgica com cloreto de sódio a 0,9% durante sete dias, sendo devolvidos aos seus tutores, logo após a retirada dos pontos.

Após tabulados os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste Student Newman Keuls (SNK) para comparação das médias dos diferentes tempos de observação dentro do mesmo grupo e entre grupos, com nível de significância estipulado de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

O protocolo anestésico utilizado em todos os animais foi adequado, assim como a analgesia proposta no pré-operatório para o GI, GII (MASTROCINQUE & FANTONI, 2003) e antibiótico para o GII. Todos os animais utilizados tiveram pronta recuperação sem intercorrências no trans e pós-operatório.

As variáveis TR, FC e FR, (Tabelas 1, 2 e 3) apresentaram comportamento semelhante durante todo período de avaliação, não havendo diferenças significativas entre os grupos e entre os tempos dentro dos grupos.

As médias da variável CS (Tabela 4) apresentaram diferenças significativas entre os grupos e entre os momentos dentro dos grupos, sendo que a maior média geral observada foi a do GII. Em relação aos momentos, o M_1 apresentou a maior média nos três grupos, apresentando diferenças estatísticas entre os grupos. Verificou-se incremento dos valores em todos os grupos, nos momentos M_0 para M_1 , sendo que a maior diferença da média dos grupos foi observada em GII, no qual ocorreu diferença significativa entre esses dois momentos. O grupo GIII apesar de aumentar o valor do CS em M_1 não apresentou diferença significativa entre ambos.

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da temperatura retal °C de cadelas submetidas à OSH, distribuídos segundo grupos e momentos

Momentos	GI	GII	GIII
M ₀	38,72±0,47 ^{Aa}	38,56±0,68 ^{Aa}	38,57±0,52 ^{Aa}
M ₁	38,78±0,60 ^{Aa}	38,75±0,68 ^{Aa}	38,35±0,74 ^{Aa}
M ₂	38,63±0,25 ^{Aa}	38,74±0,61 ^{Aa}	38,76±0,44 ^{Aa}
M ₃	38,75±0,39 ^{Aa}	38,74±0,61 ^{Aa}	38,75±0,39 ^{Aa}
M ₄	38,71±0,48 ^{Aa}	38,63±0,51 ^{Aa}	38,52±0,34 ^{Aa}
Média geral	38,69±0,43	38,69±0,58	38,69±0,43

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de significância entre grupos e momentos respectivamente.

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão da frequência cardíaca batimentos por minuto de cadelas submetidas à OSH, distribuídos segundo grupos e momentos

Momentos	GI	GII	GIII
M ₀	107,50±24,68 ^{Aa}	112,00±30,39 ^{Aa}	115,40±20,61 ^{Aa}
M ₁	104,20±17,99 ^{Aa}	111,20±13,70 ^{Aa}	99,40±11,85 ^{Aa}
M ₂	107,20±16,41 ^{Aa}	102,40±24,08 ^{Aa}	102,40±8,88 ^{Aa}
M ₃	96,60±11,15 ^{Aa}	109,60±23,94 ^{Aa}	101,60±10,90 ^{Aa}
M ₄	97,80±97,80 ^{Aa}	98,80±19,23 ^{Aa}	104,00±11,92 ^{Aa}
Média geral	102,66±17,60	106,80±22,62	104,56±12,83

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de significância entre grupos e momentos respectivamente.

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão da frequência respiratória movimentos por minuto de cadelas submetidas à OSH, distribuídos segundo grupos e momentos

Momentos	GI	GII	GIII
M ₀	54,60±12,96 ^{Aa}	55,40±26,39 ^{Aa}	49,60±21,76 ^{Aa}
M ₁	35,20±11,12 ^{Aa}	43,60±16,91 ^{Aa}	31,00±8,39 ^{Aa}
M ₂	45,80±16,66 ^{Aa}	49,20±16,65 ^{Aa}	48,00±17,88 ^{Aa}
M ₃	45,20±11,47 ^{Aa}	44,00±17,48 ^{Aa}	46,40±14,00 ^{Aa}
M ₄	40,20±14,86 ^{Aa}	45,40±12,65 ^{Aa}	42,80±16,22 ^{Aa}
Média geral	44,2±14,56	47,52±18,01	43,56±15,65

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de significância entre grupos e momentos respectivamente.

Tabela 4 - Médias e desvios-padrão da dosagem de cortisol sérico unidade $\mu\text{g/dl}$ de cadelas submetidas à OSH, distribuídos segundo grupos e momentos

Momentos	GI	GII	GIII
M ₀	3,87±1,87 ^{Aab}	4,03±1,59 ^{Aa}	3,41±1,66 ^{Aab}
M ₁	4,67±1,33 ^{Ab}	7,14±1,93 ^{Bb}	5,58±1,39 ^{ABb}
M ₂	2,96±1,38 ^{Aab}	3,56±2,37 ^{Aa}	3,88±1,41 ^{Aab}
M ₃	2,02±0,95 ^{Aa}	2,94±0,99 ^{Aa}	2,42±1,30 ^{Aa}
M ₄	2,49±1,20 ^{Aab}	3,07±1,17 ^{Aa}	2,17±1,31 ^{Aa}
Média geral	3,27±1,64	4,12±2,22	3,48±1,80

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de significância entre grupos e momentos respectivamente.

DISCUSSÃO

A variável temperatura retal foi considerada normal para a espécie canina, que varia de 37,9 a 39,9°C (DROBERTSHAAW, 2006). A frequência cardíaca foi diferente entre os grupos na média geral, valores estes em cães sadios pode variar entre 70 a 120 batimentos por minuto (ERICKSON & DETWEILER, 2006). Na média geral dos grupos a frequência respiratória foi maior em GII do que nos demais, mostrando aparentemente ser um procedimento mais estressante, cujos valores normais desses animais em repouso é de 20 a 34 movimentos respiratórios por minuto (REECE, 2006), respectivamente tiveram comportamento semelhantes entre os grupos e entre os tempos dentro dos grupos, revelando que os tratamentos usados, foram iguais.

Os mecanismos não opióides do fármaco tramadol podem potencializar a analgesia sem ocasionar alteração da TR, FC e FR não acarretando depressão respiratória, cardíaca e diminuição da temperatura (VICKERS et al., 1992; BARAKA et al., 1993; RAFFA et al., 1993; LEE et al., 1993; MASTROCINQUE & FANTONI, 2003), como observada com outros opióides (ETCHES et al., 1989; SAWYER et al., 1992; EBERT, 1996).

Os níveis de cortisol sérico foram semelhantes em todos os momentos entre os grupos GI e GIII, não havendo, portanto, elevação dos níveis. Por outro lado, houve diferença significativa entre os momentos (M₁) dentro do grupo GII, após seis horas de cirurgia ao cessarem os efeitos da anestesia, onde nenhum analgésico opióide foi utilizado, o que foi atribuído ao aumento do estresse cirúrgico cujos valores de referência para espécie canina variam de 0,5-6,0 $\mu\text{g/dl}$ (FELDMAN & NELSON, 1985).

Outros estudos mostram que cadelas submetidas à OSH apresentam aumento significativo de cortisol decorrente da dor do procedimento cirúrgico (FOX et al., 1998; KO et al., 2000; MALM et al., 2005; CALDEIRA et al., 2006).

No GIII, quando do emprego das células sanguíneas, sabe-se que as plaquetas chegam rapidamente ao local da ferida e liberam múltiplos fatores de crescimento e citocinas (HERZOG et al., 2003), que favorecem o processo de cicatrização. Estudos mostram que as citocinas Interleucina-6 (IL-6), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) estimulam ainda a síntese de receptores e peptídeos opioídes e por possuírem ações antiinflamatórias diminuem os estímulos de dor relacionados a trauma, cirurgias, queimaduras e infecção (ULICH et al., 1991; GEBHARD et al., 2000; LIN et al., 2000). No presente estudo verificamos que o uso do sangue medular associado ao tramadol atenuou a elevação do CS à semelhança do observado ao GI em que foi usado apenas o tramadol.

O fato de não terem sido observados valores elevados na concentração de CS no pré-tratamento, indução anestésica e cirurgia (Tabela 4), pode indicar que o manejo dos animais, incluindo a restrição física, venopunção e cirurgia, não interferiu sobremaneira na função neuroendócrina e metabólica, conforme observado por outros autores (FOX et al., 1998; KO et al., 2000; MALM et al., 2005; CALDEIRA et al., 2006).

CONCLUSÃO

A aplicação de sangue medular na musculatura de cadelas submetidas à OSH foi capaz de minimizar a liberação de cortisol sérico, indicando que houve diminuição da dor no pré e pós-operatório.

O uso de sangue medular no pré-operatório não alterou as variáveis fisiológicas, podendo ser usada como uma alternativa terapêutica na reparação tecidual na OSH em cadelas.

REFERÊNCIAS

- BARAKA, A. et al. A comparison of epidural tramadol and epidural morphine for postoperative analgesia. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v.40, p.308-313, 1993.
- CALDEIRA, C.M. F. et al. Cortisol sérico e glicemia em cadelas tratadas com tramadol submetidas a ovariectomia. **Ciência Rural**, v.36, p.155-160, 2006
- CONCANNON, W. P. Endocrinologia reprodutiva, contracepção e terminação da gestação em cães. In: ETTINGER, J. S.; FELDMAN, C E. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997, p. 2242-2247.
- CORTOPASSI, S. R. G. Fluidoterapia na anestesia. In: FANTONI, T. D.; CORTOPASSI, G. R. S. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002, p. 109-119.
- DAVIDSON, B. E. et al. Comparison of laparoscopic ovariohysterectomy and ovariohysterectomy in dog. **Veterinary Surgery**, v.33, p.62-69, 2004.
- DROBERTSHAAW, D. Regulação da temperatura e o ambiente térmico. In: REECE, W. O. **Dukes. Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006, p. 897-908.
- EBERT, T. J. Cardiovascular and autonomic effects of sevoflurane. **Acta Anaesthesiologica Belgica**, v.47, p.15-21, 1996.
- ERICKSON, H. H.; DETWEILER D. K. Regulação cardíaca. In: REECE, W. O. **Dukes. Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006, p. 239-251.
- ETCHES, R.C et al. Respiratory depression and spinal opioids. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v.36, p.165-85, 1989.
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. The adrenal gland. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: Saunders, 1985, p.187-322.
- FOX, S.M. et al. Changes in plasma cortisol concentrations in bitches in response to different combinations of halothane and butorphanol, with or without ovariohysterectomy. **Research in Veterinary Science**, v.65, p.125-133, 1998.
- GEBHARD, F. et al. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans. **Archives of Surgery**, v.135, p.291-295, 2000.
- HANCOCK, B.R. et al. Comparison of postoperative pain after ovariohysterectomy by harmonic, scalpel-assisted laparaloscopia compared with median celiotomy and ligation in dogs. **Veterinary Surgery**, v.34, p.273-282, 2005.

HASKINS, C. S. Equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-base: Manutenção no período pré-operatório. In: PADDLEFORD, R. R. **Manual de anestesia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001, p. 287-307.

HEDLUND, S. C. Cirurgia dos sistemas reprodutivo e genital. In: FOSSUM, W. T. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002, p. 571-637.

HERZOG, E.L. et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, p.3483-3493, 2003.

HOWE, M. L. Surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v.66, p.500-509, 2006.

KO, J. C. et al. Cardiorespiratory responses and plasma cortisol concentrations in dogs treated with medetomidine before undergoing ovariohysterectomy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p.509-514, 2000.

LEE, C.R. et al. Tramadol: A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. **Drugs**, v.46, p.313-340, 1993.

LIN, E. et al. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v.127, p.117-126, 2000.

LUNA, S. P. L. Equilíbrio Ácido-básico. In: FANTONI, T. D.; CORTOPASSI, G. R. S. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002, p. 120-129

MALM, C. et al. Ovário-histerectomia: estudo experimental comparativo entre as abordagens laparoscópica e aberta na espécie canina-III. Estresse pela análise do cortisol plasmático. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.584-590, 2005.

MASTROCINQUE, S.; FANTONI D.T. A comparison of preoperative tramadol and morphine for the control of early postoperative pain in canine ovariohysterectomy. **Veterinary Anesthesiology and Analgesia**, v.30, p.220-228, 2003.

RAFFA, R.B et al. Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.267, p.331-340, 1993.

REECE W. O. Respiração em mamíferos. **Dukes. Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006, p.103-134.

SAWYER, D.C et al. Analgesia and behavioral responses of dogs given oxymorphone-acepromazine and meperidine-acepromazine after methoxyflurane and halothane anesthesia. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.1361-1368, 1992.

ULICH, T.R. et al. Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) or granulocyte-macrophage CSF synergistically increases granulopoiesis in vivo. **Blood**. v.78, p.1954-1962, 1991.

VICKERS, M.D. et al. Tramadol: pain relief by an opioid without depression of respiration. **Anaesthesia**, v.47, p.291-296, 1992.

REFERÊNCIAS

AQUINO, L.P.C. T; MACHADO, R. Z; ALESSI, A. C; SANTANA, A. E; CASTRO, M. B; MARQUES, L. C; MALHEIROS, E. B. **Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with Trypanosoma evansi in dogs**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.54, n.1, p.8-18, 2002.

BERNARD, J. M; WOUTERS, P. F; DOURSOUT, M. F; FLORENCE, B; CHELLY, J. E; MERIN, R. G. **Effects of sevoflurane and isoflurane on cardiac and coronary dynamics in chronically instrumented dogs**. Anesthesiology. Philadelphia, v.72, n. 4, p. 659-662. 1990.

BRADLEY, L. R. Tumores vulvovaginais. In: BOJRAB, J. M. (Org.) **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo. Roca, 1996. cap. 30, p. 385 - 390.

BREAZILE, J. E. **Physiologic basis and consequences of distress in animals**. Journal of the American Veterinary Medical Association. Ithaca. v. 191, n. 10, p. 1212-1215, 1987.

CAMARGO, J. P.; FUTEMA, F; BECHARA, J. N. **Dor em pequenos animais: como estabelecer um diagnóstico preciso e precoce?** Revista Nosso Clínico. São Paulo, Ano 10. n. 59, 2007.

DINARELLO, C. A. **Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme**. Annals, New York, Academy of Sciences, v.856, n.1, p.1-11, 1998.

EIGLER, A; SINHA, B; HARTMANN, G; ENDRES, S. **Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine**. **Immunol Today**, Amsterdam, v. 18, n. 10, p. 487-492, 1997.

FANTONI, T. D. **Medicação pré-anestésica**. In: Fantoni, T. D; Cortopassi G.R.S. (Org). Anestesia em cães e gatos. São Paulo: Roca, p. 151-158, 2002.

FINGLAND, R. B. Sistema urogenital. In: BOJRAB, J. M. (Org.). **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1996. cap. 29, p. 375 - 384.

GALE, R. P; CHAMPLIN, R. E; FEIG, S. A; FITCHEN, J. H. **Aplastic anemia: biology and treatment.** Annals of Internal Medicine, Philadelphia, v.95, n.4, p.477-494, 1981.

GASPER, P. W. **The hematopoietic system.** In: FELDEMAN, B. F; ZINKL, J. G; JAIN. N. C. (Org). Schalm's veterinary hematology. Philadelphia: Williams&Wilkins, 2000. cap. 11, p. 63-68.

GOSSET, K.A. **Anemias associated with drugs and chemicals.** In: FELDMAN, B. F; ZINKL J. G; JAIN, N. C (Org). Schalm's veterinary hematology. 5 ed. Philadelphia: Williams & Wilkins. 2000. p.185-189.

GRINDEM, C. B; NEEL, J. A; JUOPPERI, T, A. **Cytology of Bone Marrow: Review.** SmallAnimalis Practice, Philadelphia: Saunders v. 32, n, 6, p.1313-1374, 2002.

HARARI, J. Sistema urogenital. In: _____. **Cirurgia de pequenos animais.** Porto Alegre: ArtMed, 1999. cap. 12, p. 196 - 222.

HIKASA, Y; OKABE, C; TAKASE, K; OGASAWARA, S. **Ventricular arrhythmogenic dose of adrenaline during sevoflurane, isoflurane, and halothane anaesthesia either with or without ketamine or thiopentone in cats.** Research in Veterinary Science. Oxford, v. 60, n. 2, p. 134-7, 1996.

JANSSENS, L. A. A; JANSSENS, G. H. R. R. Bilateral flak ovariectomy in the dog – surgical technique and sequelae in 72 animals. **Journal of Small Animal Practice,** Oxford, v. 32, n. 5, p. 249-252, 1991.

KATO, M; SUZUKI, H; MURAKAMI, M; AKAMA, M; MATSUKAWA, S; HASHIMOTO, Y. **Elevated plasma levels of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor during and after major abdominal surgery.** Journal of Clinical Anesthesia, New York, v. 9, n. 4, p. 293-298, 1997.

KRAYCHETE, D. C; CALASANS, M. T. A; VALENTE, C. M. **Citocinas Pró-inflamatórias e dor.** Revista Brasileira de Reumatologia, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

KUNKEL, S. L; STRIETER, R. M; CHENSUE, S. W; CAMPBELL, D. A; REMICK, D.G. **The role of TNF in diversepathologic processes.** Biotherapy, Boston, v.3, n. 2, p.135-141, 1991.

LAMONT, L. A; TRANQUILLI, W. J; GRIMM, K.A. **Physiology of pain.** Small Animal Practice. Philadelphia. v.30, n. 4, p.703-728, 2000.

LARUE, S. M; POWERS, E. B; WITHROW, J. S. **Biópsia óssea.** In: BOJRAB, M.J. (Org) Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais. São Paulo: Roca, 2005. p. 794-797.

LIN, H. C. **Dissociative anesthetics**. In: THURMON, J. C; TRANQUILLI, W. J; BENSON, G. J. *Veterinary Anesthesia*. 3. Ed, Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. cap. 10, p.241-296.

LOWE, D; HETTRICK, D.A; PAGEL, P. S. **Influence of volatile anesthetics on left ventricular afterload in vivo**. Differences between desflurane and sevoflurane. *Anesthesiology*. Philadelphia, v. 85, n.1, p. 112-120.1996.

LUND, J. E. **Toxicologic effects on blood and bone marrow**. In: FELDMAN, B. F. ZINKE; J. G. JAIN; N. C. (Org). *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.44.

MIGLIARI, R; DE VUONO, R. S. **Ovariosalpingohisterectomia em cadelas e gatas-proposta de novos procedimentos**. *Revista de Educação Continuada CRMV-SP, São Paulo*, v. 3, n. 3, p. 28-32, 2000.

NAKAIGAWA, Y; AKAZAWA, S; SHIMIZU, R; ISHII, R; YAMATO. R. **Comparison of the effects of halotane, isoflurane, and sevoflurane on atrioventricular conduction times in pentobarbital-anesthetized dogs**. *Anesthesia Analgesia*. Cleveland, v. 81, n. 2, p. 249-253, 1995.

NIMWEGEN, A. S. VAN; SWOL, P. F. C. VAN; KIRPENNSTEIJN, J. **Neodymium aluminum garnet surgical laser versus bipolar electrocoagulation for laparoscopic ovariectomy in dogs**. *Veterinary Surgery*, Orlando, v. 34, n. 4, p. 353-357, 2005.

OLIVEIRA, G.K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão**. 2008. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

RAEBURN, C. D; SHEPPARD, F; BARSNESS, K. A; ARYA, J; HARKEN, A. H. **Cytokines for surgeons**. *American journal of surgery*, New York, v. 183, n. 3, p. 268-273, 2002.

RASKIN, R. **Medula óssea**. In: SLATTER, D. (Org). *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. cap. 64, p. 1135-1142.

ROIT, I; BROSTOFF, J; MALE, D. **Reações imunes mediadas por células**. _____. In: *Imunologia*. 5 ed. São Paulo: Manole, 2004. cap. 10, p. 121-138.

SOMMER, C; WHITE, F. **Cytokines, chemokines, and pain**. In: BEAULIEU, P; LUSSIER, D; PORRECA, F; DICKENSON, A. H. (Org). *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, p. 279-302, 2010.

SCHAFERS, M; SVENSSON, C.I; SOMMER, C; SORKIN, L. S. **Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 mapk in primary sensory neurons**. *Journal of neuroscience*, Washington, v. 23, n. 7, p. 2517-2521, 2003.

SHORT C. E. **Principles e practice in veterinary anesthesia.**Baltimore :Willian& Wilkins, 1987. p. 669.

STONE, A. E.; CANTRELL, G. C.; SHARP, H. J. N. Ovário e útero. In: SLATTER, D.(Org.). **Manual de cirurgia de pequenos animais.** 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. cap. 93.p. 1540 - 1558.

STOCKLIN-GAUTSCH, N. M; HASSIQ, M; REICHLER I. M; HUBLER, M; ARNOLD, S. **The relationship of urinary incontinence to early spaying in bitches.**Journal of reproduction and fertility. Cambridge. v. 57, n. 2, p. 233-236, 2001.

TIZARD, R. I.Citocinas e sistema imune. **Imunologia veterinária.** 6 ed. São Paulo: Roca, 2002. cap. 12, p. 141-153.

THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. In: BIRCHARD, S.J; SHERDING, R. G. (Org.).Clínica de pequenos animais. 3 ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 141-169.

VALADÃO A. A. C. Anestésicos dissociativos. In: FANTONI T.D.; CORTOPASSI, G.R.S. (Org). **Anestesia em cães e gatos.** SãoPaulo: Roca, 2002.cap. 15,p. 165-173.

VARELLA, P. P. V; FORTE, W. C. N. **Cytokines:** a rewiew. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatolia, São Paulo, v. 24, n.4, p. 146-154, 2001.

VOLTARELLI, J. C. **Febre e inflamação.** Medicina. Ribeirão Preto. v. 27, n. 1/2, p. 47- 48, 1994.

ZHANG, J. M; AN, J.**Cytokines, inflammation, and pain.**International anesthesiology clinics, Boston, v.45, n. 2, p. 27-37, 2007.

WOLF, G; LIVSHITS, D; BEILIN, B; YIRMIYA, R;SHAVIT, Y. **Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain:** genetic and pharmacological studies in mice. Brain behavior and immunity. San Diego: Academic Press, v. 22, n. 7, 1072-1077, 2002

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
COMISSÃO DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CEEA

DECISÃO DA CEEA/CMV/UEMA
DATA DA ENTRADA DO PEDIDO: 01/08/2011
NUMERO DO PROCESSO: 025/2011
NUMERO DO PARECER: 025/2011
DATA DO PARECER: 28/10/2011

TITULO DO PROJETO: Terapêutica pré-operatório utilizando medula óssea na ovariossalpingohisterectomia em cadelas.

OBJETIVO: Avaliar a resposta inflamatória utilizando protocolo terapêutico com células sanguíneas no pré-operatório de cadelas submetidas à Ovariossalpingohisterectomia.

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA: Serão utilizadas 30 cadelas que já atingiram maturidade sexual, divididas em 3 grupos com 10 animais, provenientes da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Maranhão.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Msc. Antonio Augusto Rodrigues de Sousa (Executor) Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho (Orientadora).

EQUIPE/COLABORADORES: Priscila Francisca da Silva Jorge; Carlos Eduardo Rabêlo Lopes, Silvio Raimundo Costa Matos.

APROVADO
 EM PENDÊNCIA PARA ADEQUAÇÃO DE SUGESTÕES
 NÃO APROVADO

PARECER: Projeto aprovado por atender as normas da Resolução do CFMV nº879/2008 e a Lei 11794/2008 que tratam dos procedimentos Éticos na Experimentação Animal.

ASSINATURA DA PRESIDENTE:

DATA: 28 / 11 / 2011

Alsonia
Dra. Alsonia Lislea de Sousa
Médica Veterinária
CRMV - MA 334
Matrícula Uema 9357.

Ficha Catalográfica

Preparada pela Biblioteca Central da Universidade Estadual do Maranhão

Sousa, Antonio Augusto Rodrigues de.

Avaliação dos parâmetros fisiológicos, hematológicos e dosagens de mediadores biológicos em cadelas submetidas à ovarisalpingohisterectomia após a administração de sangue medular. Antonio Augusto Rodrigues de Sousa; 2014.

42 f

Orientadora: Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho

Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2014.

1. Osh 2. Células sanguíneas3. Cadela I. Titulo

CDU: 636.7:616-089