FABIANA GALTAROSSA XAVIER

**INTOXICAÇÃO POR ALDICARB (“CHUMBINHO”): I. ESTUDO DAS
ALTERAÇÕES *POST MORTEM* MICROSCÓPICAS EM CÃES E GATOS - II.
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS AGUDOS EM CAMUNDONGOS**

São Paulo

2008

FABIANA GALTAROSSA XAVIER

Intoxicação por aldicarb (“chumbinho”): I. Estudo das alterações *post mortem* microscópicas em cães e gatos - II. Avaliação dos efeitos tóxicos agudos em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profª. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2013
FMVZ

Xavier, Fabiana Galtarossa

Intoxicação por aldicarb (“chumbinho”): I. Estudo das alterações *post mortem* microscópicas em cães e gatos - II. Avaliação dos efeitos tóxicos agudos em camundongos / Fabiana Galtarossa Xavier. – São Paulo : F. G. Xavier, 2008.
201 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa Dra Helenice de Souza Spinosa.

1. Aldicarb. 2. Carbamatos. 3. Praguicidas. 4. Toxicologia.
5. Patologia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Intoxicação fatal por aldicarb (chumbinho) em cães e gatos: estudo das alterações *post mortem* microscópicas e comparação com dados experimentais em camundongos", protocolado sob o nº921/2006, utilizando 20 (vinte) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/06/06".

(We certify that the Research "Aldicarb poisoning in dogs and cats: study of *post mortem* microscopic lesions and comparison with experimental data in mice", protocol number 921/2006, utilizing 20 (twenty) mice, under the responsibility of Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 06/14/2006).

São Paulo, 19 de junho de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: XAVIER, Fabiana Galtarossa

Título: Intoxicação por aldicarb (“chumbinho”): I. Estudo das alterações *post mortem* microscópicas em cães e gatos - II. Avaliação dos efeitos tóxicos agudos em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Esta tese foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com bolsa de doutorado concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número: 142406/2004-0

Dedicatória

Ao meu querido esposo Dario: não há palavras que expressem a felicidade de tê-lo ao meu lado e que sejam suficientes para lhe agradecer por todo amor que tem dedicado a nossa vida. Você é a minha cara metade.

Aos meus queridos pais Ademir e Magali: pela renúncia silenciosa que nos fez seguir sempre em frente e pelo amor imenso com que conduziram os nossos passos.

*À Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, os meus sinceros agradecimentos. Por ser
Amiga e Mestre gentil, conduzindo-me sempre pelo caminho mais correto e mais
seguro.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP, por toda minha formação profissional e por ter sido um “porto seguro” durante anos especiais da minha vida.

Aos Professores do Departamento de Patologia, em especial, ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka e ao Prof. Dr. Idécio Luiz Sinhorini, e também às Dras. Cristina de Oliveira Massoco e Thaís Martins de Lima pela colaboração a este trabalho. À Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak pelo incentivo e pelo carinho sempre dedicados a mim e ao Dario.

A todos os funcionários da Biblioteca, do Departamento de Patologia e do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia da FMVZ/USP. Em particular, uma lembrança e um agradecimento especial a Shirley, pelo grande auxílio na revelação das eletromicrografias, e aos amigos Magali, Ricardo (Jibóia), Buga e Lívía.

Aos meus queridos Jubi, Ana, Luciano, Cris, “Urso” (Victor), D. Lourdes e Adne: por tudo que me proporcionam de forma incondicional e pela alegria que me trazem ao coração a cada reencontro.

Aos amigos Arianne, Graciana e Rony, porque o tempo não nos distancia e nem diminui a nossa amizade.

A minha velha e fiel companheira Ibi, prova de que o amor e a amizade não são sentimentos exclusivos dos seres humanos.

A todos os amigos da pós-graduação, pela convivência e pelos momentos de alegria, incentivo e descontração.

E ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos pequeninos irmãos que fizeram parte deste trabalho – aos cães, aos gatos e aos camundongos, e a tantos outros animais que encontrei pelo caminho, o meu reconhecimento por tornarem o meu coração mais sensível, mais completo e mais feliz.

RESUMO

XAVIER, F. G. **Intoxicação por aldicarb (“chumbinho”)**: I - Estudo das alterações *post mortem* microscópicas em cães e gatos. II - Avaliação dos efeitos tóxicos agudos em camundongos. [Aldicarb poisoning: I - Study of microscopic *post mortem* findings in dogs and cats. II - Acute toxicity evaluation in mice]. 2008. 201 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O presente trabalho propôs estudar as alterações microscópicas observadas em 100 casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos e os efeitos agudos (14 dias) induzidos por esse praguicida em camundongos após a administração de dose única oral, avaliando-se as alterações clínicas, laboratoriais, microscópicas e ultraestruturais. As principais lesões microscópicas em cães e gatos foram observadas nos pulmões (congestão, edema, hemorragia, enfisema e atelectasia), fígado (congestão, degeneração vacuolar e hemorragia) e rins (congestão, hemorragia e nefrose). Nos demais órgãos, apenas alterações circulatórias (congestão e hemorragia) foram encontradas. Em ambas espécies, considerando as alterações significantes de acordo com a faixa etária, observou-se que os animais idosos apresentaram o maior grau de intensidade de degeneração vacuolar hepática e que a congestão renal foi mais intensa nos adultos. Em camundongos, observou-se que: 1) doses superiores a 0,08 mg/kg de aldicarb promoveram a morte de todos os animais em 2,6 - 4,7 minutos após a exposição, sendo o óbito precedido por convulsões; 2) a dose de 0,08 mg/kg promoveu o rápido aparecimento dos sinais clínicos clássicos da intoxicação por anticolinesterásicos, com duração de 45 - 120 minutos, sendo esta a dose escolhida para os demais experimentos *in vivo*; 3) os camundongos expostos mostraram consumo de água superior ao do grupo controle até o 5º dia após a exposição e inferior a partir do 10º dia até o término do experimento (14º dia); 4) quanto ao consumo de ração, de forma geral, camundongos expostos ao praguicida consumiram menos que os não expostos, sendo o ganho de peso inferior ao do grupo controle nas primeiras 48 horas após a intoxicação; 5) as alterações histopatológicas, como observado em cães e gatos, ocorreram principalmente nos pulmões (edema, congestão e hemorragia), fígado (congestão e degeneração vacuolar, principalmente em zona 3) e rins (congestão, hemorragia e nefrose), sendo que as alterações degenerativas em fígado e rins foram significativamente mais intensas até 48

horas após a exposição; 6) na avaliação ultraestrutural (microscopia eletrônica de transmissão) após 24 e 48 horas da exposição, foi observada a presença de tumefação celular e mitocondrial e, após 48 horas, a presença de vacúolos citoplasmáticos hepáticos, os quais continham gordura pela avaliação histoquímica; nos rins foram observadas também desorganização, tumefação e despregamento celulares, além da presença de conteúdo intratubular; 7) os principais achados do hemograma foram a diminuição no número de hemácias após 24 horas da exposição e leucopenia, que persistiu até o 7º dia da intoxicação; 8) entre as alterações bioquímicas relevantes estão o aumento da glicemia e da amilase após 24 horas da exposição, bem como dos triglicerídeos e da creatinina até 48 horas após o quadro agudo; 9) os principais achados nos ensaios de imunotoxicidade foram o aumento do peso relativo do timo e da celularidade do baço, bem como a diminuição da celularidade da medula óssea nas primeiras 48 horas após a exposição; 10) avaliando-se a indução de morte celular por apoptose e/ou necrose pelo aldicarb em hepatócitos e leucócitos *in vitro*, constatou-se que o aldicarb promove tanto apoptose quanto necrose de leucócitos de camundongos e que é capaz de aumentar a porcentagem de hepatócitos com apoptose, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Tomando-se estes resultados em conjunto, foi possível constatar que a exposição oral aguda grave ao aldicarb produz efeitos nocivos graves, principalmente nos pulmões, fígado, rins, pâncreas e sistema imune, notadamente nas primeiras 48 horas após a exposição.

Palavras-chave: Aldicarb. Carbamatos. Praguicidas. Toxicologia. Patologia.

ABSTRACT

XAVIER, F. G. **Aldicarb poisoning**: I. Study of microscopic *post mortem* findings in dogs and cats – II. Acute toxicity evaluation in mice. [Intoxicação por aldicarb (“chumbinho”): I. Estudo das alterações *post mortem* microscópicas em cães e gatos. II - Avaliação dos efeitos tóxicos agudos em camundongos]. 2008. 201 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The present study evaluated microscopic *post mortem* findings in 100 cases of aldicarb intoxication in dogs and cats and the acute toxicity in mice induced by a single dose of aldicarb, assessing the clinical, laboratorial, microscopic and ultrastructural alterations caused by aldicarb up to 14 days after exposition. The most commonly affected organs in dogs and cats were lung (congestion, edema, hemorrhage, emphysema and/or atelectasy), liver (congestion, vacuolar degeneration and/or hemorrhage) and kidney (congestion, hemorrhage and/or nephrosis); the other organs showed circulatory alterations, as congestion and hemorrhage. Considering both species and age we observed that old animals had the most intensity of hepatic vacuolar degeneration and the adult animals the most intensity of renal congestion. Experimental oral aldicarb poisoning resulted in death if mice were exposed to more than 0.08mg/kg, preceded by seizures. Rapid and classical symptoms of anticholinesterase poisoning occurred within 45 minutes to 2 hours after exposure to 0.08mg/kg of oral aldicarb. Animals exposed to 0.08mg/kg of aldicarb presented increased water intake until day 5, followed by decreased water intake from day 10 to day 14 after exposure to the drug in comparison to control animals. Food intake was also decreased in the experimental group. Blood analyses revealed decreased erythrocyte count and leukopenia started 24 hours after exposure and persistent for 7 days. Hyperglycemia, hypertriglyceremia, elevation of amylase and creatinine happened after 24 to 48 hours after exposure. Microscopic evaluation revealed: (i) lung edema, pulmonary congestion and/or pulmonary hemorrhage; (ii) liver congestion and zonal vacuolar degeneration of the liver; (iii) renal congestion, nephrosis and/or kidney hemorrhage. Those alterations were more prominent after 24 to 48 hours of exposure to aldicarb. Ultrastructural analysis (transmission electron microscopy) demonstrated: (i) cellular edema and mitochondrial

swelling after 24 and 48 hours after exposure to aldicarb; (ii) lipid vacuoles in hepatocytes after 48 hours of exposure; (iii) renal tubular epithelium disorganization with swelling and intratubular cell exfoliation. Increased thymus/body weight ratio and spleen cellularity and decreased bone marrow cellularity were also found after 48 hours of aldicarb exposure. Aldicarb was able to induce leukocyte death by necrosis and/or apoptosis *in vitro* and hepatocyte apoptosis *in vivo* and *in vitro*. Altogether, our findings demonstrated that acute oral exposure to aldicarb induces toxic effects mainly to the lungs, liver, kidneys, pancreas, and immune system. Those effects are more evident up to 48 hours after intoxication.

Keywords: Aldicarb. Carbamates. Pesticides. Toxicology. Pathology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Praguicidas carbamatos: aspectos gerais	23
2.2 Aldicarb	26
2.3 Alterações anatomo-histopatológicas encontradas nas intoxicações pelo aldicarb	31
2.4 Respostas teciduais a injúrias externas: alterações circulatórias	35
2.5 Respostas celulares a injúrias externas: alterações reversíveis (degenerativas) e irreversíveis (morte celular)	37
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Estudo das alterações <i>post mortem</i> microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos	46
4.1.1 <i>Casuística</i>	46
4.1.2 <i>Crítérios de inclusão</i>	47
4.1.3 <i>Histopatologia</i>	47
4.1.4 <i>Documentação fotográfica</i>	48
4.2 Intoxicação experimental por aldicarb (Temik®) em camundongos	48
4.2.1 <i>Animais</i>	48
4.2.2 <i>Drogas, reagentes e soluções</i>	49
4.2.3 <i>Preparo das soluções</i>	51
4.2.4 <i>Métodos</i>	54
4.2.4.1 Determinação da dose a ser utilizada nos experimentos	54
4.2.4.2 Observações clínicas	54
4.2.4.3 Avaliação do ganho de peso, do consumo de ração e de água	55
4.2.4.4 Estudo das alterações teciduais microscópicas e ultraestruturais	55
4.2.4.4.1 MICROSCOPIA ÓPTICA	55
4.2.4.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	56
4.2.4.4.3 HISTOQUÍMICA	58
4.2.4.5 Hemograma	58

4.2.4.6 Bioquímica sérica.....	60
4.2.4.7 Avaliação do peso relativo de timo, baço e fígado, celularidade de baço e avaliação histológica dos órgãos linfóides.....	61
4.2.4.8 Avaliação global das células da medula óssea.....	61
4.2.4.9 Quantificação dos corpúsculos apoptóticos hepáticos.....	62
4.2.4.10 Avaliação <i>in vitro</i> da morte de leucócitos por necrose/apoptose.....	62
4.2.4.11 Avaliação <i>in vitro</i> da morte de hepatócitos por necrose/apoptose.....	67
4.3 Análise estatística.....	68
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	69
5.1 Estudo das alterações <i>post mortem</i> microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos.....	70
5.1.1 <i>Casuística</i>	70
5.1.2 <i>Alterações histopatológicas</i>	71
5.2 Intoxicação experimental por aldicarb (Temik®) em camundongos.....	86
5.2.1 <i>Experimento 1: Determinação da dose tóxica a ser utilizada nos experimentos</i>	86
5.2.2 <i>Experimento 2: Observações clínicas e histopatológicas da intoxicação por aldicarb (Temik®) em camundongos</i>	87
5.2.3 <i>Experimento 3: Avaliação do consumo de água e ração e do ganho de peso de camundongos expostos a dose única oral de aldicarb (Temik®)</i>	91
5.2.4 <i>Experimento 4: Avaliação das alterações microscópicas após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: estudo por microscopia óptica</i>	96
5.2.5 <i>Experimento 5: Avaliação das alterações ultraestruturais após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: estudo por microscopia eletrônica de transmissão</i>	106
5.2.6 <i>Experimento 6: Avaliação das alterações microscópicas após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: avaliação histoquímica hepática para glicogênio e gordura</i>	109
5.2.7 <i>Experimento 7: Estudo das alterações hematológicas após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: avaliação após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias</i>	112

5.2.8 Experimento 8: Avaliação das alterações bioquímicas após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: avaliação após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias.....	120
5.2.9 Experimento 9: Avaliação do peso relativo de timo, baço e fígado, e celularidade do baço após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: efeitos após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias.....	131
5.2.10 Experimento 10: Avaliação global das células da medula óssea após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: efeitos após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias.....	135
5.2.11 Experimento 11: Avaliação in vivo da apoptose - quantificação dos corpúsculos apoptóticos hepáticos e avaliação das lesões microscópicas.....	137
5.2.12 Experimento 12: Avaliação in vitro da morte de leucócitos por necrose/apoptose – estudo por citometria de fluxo.....	143
5.2.13 Experimento 13: Avaliação in vitro da morte de hepatócitos por necrose/apoptose – estudo por citometria de fluxo.....	147
6 DISCUSSÃO.....	151
6.1 Estudo das alterações <i>post mortem</i> microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos.....	152
6.2 Intoxicação experimental por aldicarb (Temik®) em camundongos.....	157
6.3 Considerações consolidadas sobre a exposição ao aldicarb.....	175
7 CONCLUSÕES.....	180
REFERÊNCIAS.....	184

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O emprego dos praguicidas trouxe grandes benefícios para a produção de alimentos e controle de pragas, auxiliando no controle de doenças transmitidas por artrópodes e outros vetores, desde o início de sua utilização pela humanidade (TALCOTT; DORMAN, 1997; KALKAN et al., 2003). Apesar disto, ao lado das vantagens da utilização destes compostos, sabe-se que seu amplo uso traz importantes implicações toxicológicas, já que as intoxicações em seres humanos e animais podem ocorrer em virtude do mau uso ou após a exposição ao solo, ar, água e alimentos contaminados (MORGULIS et al., 1998).

Estudos sobre a epidemiologia das intoxicações em seres humanos e animais domésticos e silvestres, em vários países, mostram que os praguicidas aparecem sempre entre os principais agentes envolvidos nas intoxicações, sejam elas acidentais ou intencionais e, dentre eles, os agentes anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos) são os mais freqüentemente citados (HORNFELODT; MURPHY, 1992; SPINOSA; FLÓRIO, 1993; ANTONIOU; TALCOTT; DORMAN, 1997; ZANTOPOULOS; TSOUKALI, 1997; GUITART et al., 1999; CALZETTA et al., 2002; XAVIER; KOGIKA; SPINOSA, 2002; KALKAN et al., 2003; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; PROENÇA et al., 2004; WANG et al., 2007; XAVIER, RIGHI, SPINOSA, 2007; FIOCRUZ, 2008).

O aldicarb foi introduzido na agricultura na década de 1960 com o objetivo de controlar uma ampla variedade de insetos, ácaros e nematódeos (TRACQUI et al., 2001). No Brasil, ele é manufaturado na forma de pequenos grânulos pretos, com 15% de princípio ativo (Temik 150[®]), e é popularmente conhecido como “chumbinho”, dado o seu aspecto granular da cor do chumbo.

Este praguicida é considerado um dos carbamatos mais potentes disponíveis comercialmente e um dos praguicidas mais tóxicos registrados, sendo que sua aplicação inapropriada, distribuição e uso ilegal têm sido apontados como responsáveis pelo grande número de casos de intoxicações e mortes em seres humanos e em animais (GRENDOM; FROST; BAUM, 1997). Com exceção da tentativa de suicídio, a maioria das intoxicações severas por aldicarb em seres humanos ocorre pelo seu uso inadequado como raticida doméstico (MORAES, 1999; TRACQUI et al., 2001) e, em animais, geralmente têm caráter criminoso (XAVIER, RIGHI, SPINOSA, 2007).

Em medicina veterinária, dados nacionais e internacionais mostram a participação do aldicarb como agente tóxico utilizado para exterminar animais de companhia ou silvestres, estando este problema sempre relacionado ao seu uso ilegal e criminoso (DELAUNOIS et al., 1997; FRAZIER et al., 1999; GUITART et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; XAVIER et al., 2007). No Brasil, recentemente, um estudo realizado com 1633 cães e gatos recebidos em um Serviço de Necropsia Veterinário mostrou que, dos 234 (14,3%) casos relacionados à intoxicação exógena, o aldicarb foi o agente tóxico mais comum, sendo responsável por 89% dos casos de intoxicação em cães e 94,4% dos casos em gatos (XAVIER, 2004; XAVIER et al., 2007). No mesmo sentido, outros trabalhos destacaram a participação deste carbamato nas intoxicações animais no Brasil (SPINOSA; FLÓRIO, 1993; LOBO JR., 2003; GUIMARAES et al., 2005; ALMEIDA et al., 2007; XAVIER, RIGHI, SPINOSA, 2007) e em outros países (FRAZIER et al., 1999; GUITART et al., 1999).

Apesar da importância do aldicarb como agente responsável por toxicose, poucos relatos existem na literatura sobre as alterações macroscópicas e histopatológicas encontradas em animais intoxicados com aldicarb. Em nosso trabalho anterior (XAVIER, 2004), além do estudo epidemiológico dos casos de intoxicação em cães e gatos recebidos pelo Serviço de Necropsia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP e do desenvolvimento de metodologia diagnóstica para as intoxicações por aldicarb (cromatografia em camada delgada), foram descritas todas as alterações *post mortem* macroscópicas de 214 casos de intoxicação causada por este carbamato.

Nesse sentido, dando continuidade a este estudo e considerando a escassez na literatura de avaliações histopatológicas em animais intoxicados, o presente trabalho propôs realizar um estudo das alterações microscópicas encontradas em cães e gatos intoxicados com aldicarb, completando a descrição das alterações *post mortem* encontradas anteriormente por nós e, portanto, contribuindo para o melhor entendimento das graves alterações orgânicas que acometem o animal intoxicado por este praguicida. Além disso, considerando-se que um animal sadio ou não pode ser intencionalmente intoxicado e que, portanto, algumas alterações não relacionadas ao agente tóxico podem ser encontradas durante o exame necroscópico, realizou-se também estudo experimental com o aldicarb em camundongos, com avaliação das alterações clínicas e laboratoriais induzidas pelo carbamato, bem como das alterações microscópicas encontradas, durante o período de até 14 dias após a exposição. Assim, pretendeu-se correlacionar achados clínicos com aqueles obtidos experimentalmente, na tentativa de caracterizar as

alterações microscópicas que se devem exclusivamente à ação tóxica do praguicida e conseqüente indicação dos órgãos mais afetados e das possíveis repercussões clínicas, fornecendo, desta forma, subsídios para a estratégia terapêutica das intoxicações agudas pelo aldicarb em cães e gatos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Será apresentada a seguir uma revisão dos dados da literatura referentes aos aspectos gerais dos praguicidas carbamatos, sobre o aldicarb e sobre as alterações anatomo-histopatológicas encontradas nas intoxicações por este praguicida. Além disso, serão abordadas também as respostas teciduais circulatórias à injúrias externas e as respostas celulares reversíveis e irreversíveis a este tipo de injúria.

2.1 Praguicidas carbamatos: aspectos gerais

O primeiro praguicida derivado do ácido carbâmico foi sintetizado em 1930 e possuía propriedades fungicidas; a partir da metade dos anos de 1950, ampliou-se o interesse por inseticidas com atividade anticolinesterásica e baixa toxicidade, levando à síntese de vários aril-ésteres do ácido metilcarbâmico, elaborados a partir de alterações químicas da fisostigmina – alcalóide com atividade anticolinesterásica obtida da *Physostigma venenosum* (GILMAN et al., 1996). Em 1950, iniciou-se a comercialização dos carbamatos carbaril e sevin, seguindo-se a do propoxur em 1959 e a do aldicarb em 1965 (CAZENAVE et al., 2005).

O grupo dos carbamatos é formado por derivados do ácido N-metil-carbâmico e dos ácidos tiocarbamatos e ditiocarbamatos, sendo que estes últimos não são inibidores das colinesterases; entre os derivados do ácido N-metil-carbâmico, incluem-se os metil-carbamatos (aldicarb e carbaril), os carbamatos fenil-substituídos (propoxur) e os carbamatos cíclicos (carbofurano) (ALONZO; CORRÊA, 2003). São usados como inseticidas, herbicidas e fungicidas, mas apenas o primeiro grupo apresenta marcante atividade anticolinesterásica (KERR et al., 1991; MARRS; DEWHURST, 1999).

Os carbamatos são amplamente utilizados e, no Brasil, os registrados para uso agrícola são: o aldicarb (Temik[®]), o carbaril (Sevin[®], Carbaryl[®]), o carbofurano (Furacarb[®], Carboran[®], Furadan[®]), o metomil (Methomex[®], Lannate[®]), o benfuracarb (Afitrix[®]), o mancozeb (Triziman[®]), o carbosulfano (Fênix[®]), o cloridrato de propamocarbe (Previan[®], Tattoo[®]), o ipravolicarb (Pósitron Duo[®]); os registrados para uso veterinário são o carbaril (Curadil[®], Farमारil[®]), o metomil (Vetomil[®]) e o propoxur

(Kiltix[®], Tanidil[®], Bolfo[®]), entre outros (TUCCI, 2005; COMPÊNDIO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS, 2008; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2008).

Alguns carbamatos são considerados moderadamente tóxicos, como o carbaril, cuja dose letal 50% (DL₅₀) em ratos é de 850 mg/kg, e outros extremamente tóxicos, como o aldicarb, com DL₅₀ em ratos variando de 0,6 a 1,23 mg/kg (FRAZIER et al., 1999; MORAES, 1999; COBB; HARPER; WEISSKOPF, 2001).

Os carbamatos, juntamente com os organofosforados, são conhecidos como praguicidas anticolinesterásicos, pois ambos exercem sua toxicidade por meio da inibição da enzima acetilcolinesterase. A acetilcolina é sintetizada no neurônio a partir da acetilcoenzima A e da colina. A sua inativação se dá por hidrólise, sob a ação da acetilcolinesterase, com formação de colina e ácido acético, que, por sua vez, são reutilizados para a formação da acetilcolina (CALDAS, 2000). Quando há a inibição da acetilcolinesterase, portanto, ocorre o acúmulo da acetilcolina na fenda sináptica, levando a uma estimulação excessiva dos receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos (GILMAN et al., 1996; ANDRADE FILHO; ROMANO, 2001; ANDRADE et al., 2002).

Diferentemente da enzima fosforilada, a enzima carbamilada pode ser pronta e espontaneamente hidrolisada a sua forma original, com rápida recuperação da sua atividade (inibição reversível), sem a ocorrência de intoxicação acumulativa (BARON, 1994; MARRS; DEWHURST, 1999). Apesar desta ação geralmente transitória, encontram-se na literatura relatos de inibição prolongada (mais de 60 horas) em seres humanos intoxicados com o carbamato aldicarb (MORITZ et al., 1994; RAGOUCY-SENGLER et al., 2000).

Em cães e gatos, a intoxicação por praguicidas anticolinesterásicos evolui progressivamente, iniciando-se com um quadro de agitação (movimentação compulsiva com ou sem interação com o meio ambiente), evoluindo para hipoexcitabilidade (estado de prostração e apatia, mesmo perante estímulos externos) ou hiperexcitabilidade (estado geral de excitação excessiva, inclusive frente a estímulos externos) (NORSWORTHY, 2004). É comum a ocorrência de sialorréia, observada em maior intensidade nos gatos, e tremores musculares; segue-se a miose, micção frequente, diarreia, bradicardia, dor abdominal e êmese (CARLSON, 1988; NORSWORTHY, 2004). A ocorrência de bradicardia é mais comum, mas pode haver taquicardia pela liberação de catecolaminas pelas adrenais (GFELLER; MESSONNIER, 1998). Em

casos severos, observa-se cianose e dispnéia, em virtude do acúmulo de secreções respiratórias e de broncoconstrição, além de depressão acentuada do sistema nervoso central – SNC (NORSWORTHY, 2004); a morte advém da hipóxia resultante das alterações respiratórias e da bradicardia (CARLSON, 1988).

Há relatos de pancreatite aguda em seres humanos intoxicados com carbamatos e organofosforados, com elevação da amilase e lipase sangüínea em valores três ou mais vezes superiores aos normais (MORITZ et al., 1994; ROSATI, 1995; CALDAS, 2000). Entre os carbamatos envolvidos na indução de pancreatite, está o aldicarb (MORITZ et al., 1994; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000). Por isso, nos casos de sensibilidade abdominal, é importante a avaliação das enzimas pancreáticas amilase e lipase, devido ao risco de pancreatite aguda (MORITZ et al., 1994; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000).

A ocorrência de pancreatite pode ser o resultado do aumento da pressão intraductal e aumento da secreção exócrina pancreática causados pela estimulação colinérgica, levando a ocorrência de pancreatite obstrutiva (MORITZ et al., 1994; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000). Contribuem também para a lesão ao pâncreas, a hipóxia e o insulto isquêmico promovido pelas alterações cardiorrespiratórias comuns nas intoxicações graves por anticolinesterásicos (MORITZ et al., 1994). O retorno à normalidade dos níveis plasmáticos das enzimas tende a ocorrer dentro de dez dias (RAGOUCY-SEGLER et al., 2000).

Como variação provavelmente secundária à pancreatite, os inibidores da acetilcolinesterase podem causar hiperglicemia transitória até cinco vezes superior aos valores normais (GARBER, 1987; FERREIRA; BARBOSA; ROSATI, 1992; MORITZ et al., 1994; CALDAS, 2000; ALONZO; CORRÊA, 2003), com retorno a normalidade após 48 horas da exposição (MORAES, 1999).

Entre outras alterações laboratoriais descritas para os carbamatos, estão a elevação dos níveis séricos de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase – AST e alanina aminotransferase - ALT) e alterações hematológicas, com leucocitose ou leucopenia (linfopenia) transitórias, além de alterações na coagulação sangüínea, glicosúria e proteinúria (GARBER, 1987; MORITZ et al., 1994; CALDAS; UNES, 1998; MORAES, 1999).

Quanto aos efeitos tardios da intoxicação por praguicidas anticolinesterásicos, estão a ocorrência de neuropatia periférica tardia (dores musculares, fraqueza muscular progressiva e diminuição dos reflexos tendinosos que ocorrem após 2 a 3 semanas ou

até meses após a exposição) e da síndrome intermediária (paralisia da musculatura proximal dos membros, da musculatura flexora do pescoço e da musculatura respiratória que ocorre 24 a 96 horas após a crise colinérgica aguda), alterações bastante descritas para organofosforados e menos freqüentemente para carbamatos (BURGESS; BERNSTEIN; HURLBUT, 1994; LEON et al., 1996; ANDRADE FILHO; ROMANO, 2001).

A neuropatia periférica tardia pode ocorrer devido à inativação de uma enzima específica do tecido nervoso chamada esterase alvo da neuropatia ou esterase neurotóxica (*neuropathy target esterase* ou *neurotoxic esterase* – NTE), com conseqüente degeneração axonal, podendo ter recuperação lenta e parcial (JOHNSON, 1993; ANDRADE FILHO; ROMANO, 2001; ALONZO; CORRÊA, 2003). Os carbamatos associados à neuropatia periférica tardia foram o carbaril e o *m*-tolil metilcarbamato (ALONZO; CORRÊA, 2003).

2.2 Aldicarb

O aldicarb ou 2-metil-2(metiltio)-propionaldeído O-(metilcarbamoil) oxima, um metil-carbamato, foi sintetizado em 1965 por L. K. Payne e M. H. J. Weiden e introduzido na agricultura em 1970, com o nome de Temik, com uso recomendado nas culturas de algodão (CAZENAVE et al., 2005). Pela sua alta eficácia, passou a ser registrado mundialmente como inseticida, acaricida e nematicida para uma ampla variedade de culturas agrícolas (FARLEY; MCFARLAND, 1999; HODGSON et al., 2000; RAGOUCY-SENGLER et al., 2000; COBB; HARPER; WEISSKOPF, 2001). Apesar de ter seu uso restrito desde o final da década de 1980, tem sido ilegalmente utilizado como raticida doméstico no Brasil, o que favorece a ocorrência de diversos casos de intoxicações agudas e óbitos em animais e seres humanos (MORAES, 1999; PROENÇA et al., 2004; CAZENAVE et al., 2005; XAVIER et al., 2007).

Este praguicida, manufaturado na forma de grânulos, é aplicado diretamente no solo, o qual, quando umedecido, leva a liberação do princípio ativo (RAGOUCY-SENGLER et al., 2000; TRACQUI et al., 2001). Após a aplicação, é absorvido pela raiz e distribuído por todo vegetal, de forma que a simples lavagem da planta não é

suficiente para eliminar o agente tóxico (BURGESS; BERNSTEIN; HURLBUT, 1994; GOLDMAN, 1995).

Como é absorvido sistemicamente pelas plantas, o consumo de certos produtos inadequadamente tratados pode resultar em exposição, além da possibilidade de contaminação de águas subterrâneas, devido a sua alta solubilidade em água (GOLDMAN; BELLER; JACKSON, 1990; BURGESS; BERNSTEIN; HURLBUT, 1994; HODGSON et al., 2000). Conforme critérios estabelecidos pela *United States Environmental Protection Agency* – EPA, o limite máximo do aldicarb em águas de consumo público deve ser de 3,0 ppb (CAZENAVE et al., 2005).

O maior surto de intoxicação alimentar por aldicarb ocorreu nos Estados Unidos da América (EUA) em 1985, quando 1.373 pessoas se intoxicaram após a ingestão de melancias cultivadas em solo tratado com o praguicida (FARLEY; MCFARLAND, 1999). O último caso de intoxicação alimentar com aldicarb publicado ocorreu no Brasil e envolveu três membros de uma mesma família que apresentaram sinais de toxicose após a ingestão de vegetais (MENDES et al., 2005).

Após ser prontamente absorvido por qualquer uma das vias de exposição, o aldicarb é rapidamente oxidado a aldicarb sulfóxido (ASX) e uma porção deste é lentamente degradada a aldicarb sulfona (ASN) antes de ser hidrolisado a agentes não colinérgicos (BARON, 1994; HARPER et al., 1998). A ingestão de doses acima de 0,1 mg/kg de aldicarb é suficiente para promover sinais clínicos de toxicose, que podem ocorrer tão rapidamente quanto cinco minutos (BURGESS; BERNSTEIN; HURLBUT, 1994; CAZENAVE et al., 2005). Pela sua alta toxicidade, a EPA classifica o aldicarb dentro da categoria 1, que agrega os praguicidas mais tóxicos disponíveis (RAGOUCY-SENGLER et al., 2000), com provável DL_{50} oral para os humanos de 5,0 mg/kg (CAZENAVE et al., 2005).

O aldicarb e seu metabólito ASX possuem toxicidade aguda semelhante para mamíferos, embora este último seja um inibidor mais potente da acetilcolinesterase, apresentando DL_{50} oral para ratos de 0,49 a 1,41 mg/kg; o ASN é menos tóxico que o aldicarb, com DL_{50} oral para ratos de 20,0 a 27,0 mg/kg, mas é bem mais persistente, o suficiente para que os produtos de degradação restantes nos tecidos das plantas lhe permitam o controle de pragas por mais de oito semanas (BURGESS; BERNSTEIN; HURLBUT, 1994; CAZENAVE et al., 2005). Estes compostos têm sido apontados como indicadores da exposição ao aldicarb, embora sejam estáveis por, no máximo, dois dias em animais vivos ou mortos (HARPER et al., 1998; COBB et al., 2001).

Como a maioria dos carbamatos, o aldicarb possui meia-vida curta, sendo eliminado na forma de ASX e oxima sulfóxido (MCENTEE et al., 1994; WEXLER, 1998; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000). A administração oral de isótopos radiomarcados a ratos mostrou que a excreção do aldicarb foi de 80 a 90% realizada pela via renal e de 2 a 5% pela via fecal, após 24 horas da exposição (KNAAK; TALLANT; SULLIVAN, 1966; ANDRAWES; DOROUGH; LINDQUIST, 1967). Além disso, foi demonstrado ocorrer circulação enterohepática do aldicarb e produtos da degradação, com reabsorção dos metabólitos biliares no intestino e posterior excreção pela via urinária (CAZENAVE et al., 2005).

Ainda em ratos, estudos mostraram que a absorção gastrointestinal do aldicarb é bastante rápida, com ampla distribuição tecidual e sinais clínicos ocorrendo em até 5 minutos após a exposição (ANDRAWES; DOROUGH; LINDQUIST, 1967; CAMBON; DECLUME; DERACHE, 1979). Esta distribuição inclui a passagem do aldicarb pela barreira hematoencefálica, promovendo distúrbios neurológicos nos indivíduos expostos (BOYD; WEILER; PORTER, 1990; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000). Lima e Reis (1995) atentam para a influência da depressão respiratória no agravamento dos sinais neurológicos observados na toxicose pelo aldicarb.

Em medicina veterinária, há relatos do emprego do aldicarb como agente tóxico de escolha para intoxicar intencionalmente animais domésticos, em função de sua alta toxicidade, baixo custo e fácil acesso (FRAZIER et al., 1999; GUITART et al., 1999; VERSTER et al., 2004; GUIMARAES et al., 2005; MARTÍNEZ-HARO et al., 2007) e também de animais silvestres, principalmente predadores, em países onde existe a caça esportiva (MOTAS-GUZMÁN et al., 2003). Neste sentido, na Espanha, Martínez-Haro et al. (2007) destacam o aldicarb como um dos três principais agentes tóxicos envolvidos amplamente nas intoxicações animais, juntamente com o carbofurano e a estricnina.

Em estudo recente realizado na região sudeste do Brasil sobre a casuística das intoxicações em cães e gatos (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007), o aldicarb foi o agente tóxico encontrado com maior frequência, responsável por 89,0% (113/117) das intoxicações em cães e 94,4% (101/107), em gatos. Em todos estes casos, as intoxicações tiveram caráter intencional e os animais apresentavam indícios do agente tóxico no conteúdo gástrico ou em alimentos utilizados supostamente como iscas para este propósito criminoso. Em seres humanos que vieram a óbito após exposição oral ao aldicarb, o achado das granulações em conteúdo gástrico durante o procedimento

necroscópico também foi relatado (PROENÇA et al., 2004), bem como no conteúdo ruminal de ovelhas (DORMAN et al., 1992), auxiliando na condução da investigação diagnóstica.

O quadro de intoxicação por aldicarb é semelhante ao promovido pelos demais praguicidas anticolinesterásicos, mas, por se tratar de um agente extremamente tóxico, tende a iniciar seus efeitos rapidamente, podendo levar o paciente ao óbito em poucos minutos após a exposição oral. A morte pode ocorrer dentro de minutos a horas após a exposição e é atribuída principalmente à excessiva secreção pulmonar, constrição bronquiolar e paralisia respiratória (DORMAN et al., 1992).

Nos casos em que os animais ingerem grande quantidade do carbamato, o vômito promove, muitas vezes, a eliminação de grande parte desta substância, reduzindo a dose final absorvida. Por outro lado, aqueles animais que não a eliminam pelo vômito, têm grande possibilidade de virem a óbito em poucos minutos, devido à rápida absorção e gravidade das alterações orgânicas (GUIMARAES et al., 2005). Portanto, o prognóstico vai depender principalmente da quantidade ingerida e do tempo decorrido entre a exposição e o primeiro atendimento, com a instituição de medidas que impeçam a absorção do agente tóxico, como a lavagem gástrica e a indução do vômito nos animais conscientes, e a administração da atropina.

Em cães e gatos intoxicados pelo aldicarb e por outros anticolinesterásicos, recomenda-se, como medida específica, a administração do sulfato de atropina na dose de 0,1 a 0,5 mg/kg (HANSEN, 1995; BLODGETT, 2006), sendo que um quarto da dose deve ser administrada pela via intravenosa (IV) e o restante pela via subcutânea (SC) ou intramuscular (IM). Deve-se utilizar a menor dose efetiva possível, dada a possibilidade de que sejam necessárias várias repetições, baseadas no reaparecimento ou na persistência dos sinais respiratórios. Além disso, quando houver dispnéia severa, a oxigenoterapia deve ser realizada, a fim de prover a demanda aumentada de oxigênio exigida pelo miocárdio (GFELLER; MESSONNIER, 2006).

É possível a ocorrência de convulsões neste tipo de toxicose, sendo necessária a administração cautelosa de benzodiazepínicos, como o diazepam, na dose de 0,5 a 1,0 mg/kg, IV (ALLEN, 1998). Além disso, é importante o tratamento da acidose, caso seja apontada na gasometria, por meio da fluidoterapia e administração do bicarbonato de sódio (GFELLER; MESSONNIER, 2006).

O uso das oximas nas intoxicações por carbamatos, incluindo o aldicarb, é contra-indicado, em virtude da ligação do praguicida aos dois sítios ativos da enzima

acetilcolinesterase, podendo causar agravamento do quadro clínico (BURGESS; BERNSTEIN; HURLBUT, 1994; LIFSHITZ et al., 1994; RAGOUCY-SENGLER et al., 2000; ANDRADE FILHO; ROMANO, 2001).

As manifestações cardíacas da intoxicação pelo aldicarb podem conduzir a hipoxemia e desequilíbrio eletrolítico; da mesma forma, a associação de hipotermia, hipocalemia e acidose, que participam da sintomatologia sistêmica induzida pelo agente tóxico, contribuem para potencializar a cardiotoxicidade (RAGOUCY-SENGLER et al., 2000). Em um estudo clínico realizado com 11 cães e 5 gatos intoxicados por aldicarb, diversas alterações eletrocardiográficas foram encontradas, destacando-se aquelas observadas no segmento ST e distúrbios de condução no ramo descendente da onda R em cães e a ocorrência de arritmias graves em gatos (LOBO JR., 2003).

Em 3 cães intoxicados por aldicarb, sinais clínicos compatíveis com a síndrome intermediária foram observados 2 a 4 dias após a exposição, sendo representados principalmente por ptose palpebral, hiporreflexia e flacidez da musculatura do pescoço (LOBO JR., 2003). Achados semelhantes são descritos na espécie humana em indivíduos que desenvolveram a síndrome intermediária após a exposição à organofosforados (HE et al., 1998).

Quanto aos efeitos crônicos atribuídos à exposição a carbamatos em animais, foram relatadas alterações de comportamento após a administração subaguda ou crônica de diferentes carbamatos, além da possível indução de neuropatia periférica (GRENDON; FROST; BAUM, 1994; WEXLER, 1998). Mcentee et al. (1994) relataram um caso envolvendo um cão intoxicado pelo aldicarb e que, no segundo dia pós-exposição, desenvolveu sinais de polimiopatia, com hipertonicidade muscular, mialgia, mioglobínúria e aumento significativo da atividade sérica das enzimas musculares. A polimiopatia aguda foi confirmada através dos resultados da eletromiografia.

Embora o aldicarb não exerça efeitos carcinogênicos, reprodutivos ou teratogênicos, alguns estudos demonstram que este praguicida altera parâmetros hematológicos e bioquímicos (DEAN et al., 1990b). Além disso, seus efeitos sobre o sistema imune ainda não estão bem esclarecidos e alguns trabalhos reportam o possível efeito do aldicarb como imunomodulador, principalmente alterando funções de macrófagos (SELVAN et al., 1989; DEAN et al., 1990a; DEAN et al., 1990b).

O diagnóstico da intoxicação por aldicarb é embasado, via de regra, na avaliação clínica e na medida da atividade das colinesterases plasmática e eritrocitária. Além das

provas anteriores, o conteúdo estomacal de animais de companhia constitui excelente matriz para a identificação laboratorial do aldicarb em virtude da alta solubilidade dos grânulos no fluído gástrico, intervalo extremamente curto entre a ingestão, início dos sinais clínicos e morte, além do efeito estabilizante do pH ácido estomacal de monogástricos sobre o aldicarb (FRAZIER et al., 1999; XAVIER et al., 2007). A administração deste conteúdo por intubação gástrica em camundongos é um método utilizado com finalidade diagnóstica, pois produz quadro clínico clássico, com intervalo de latência de 5 a 15 minutos para o início de episódios de convulsões clônicas intensas e óbito (MOTAS-GUZMÁN, 2003).

A cromatografia em camada delgada (CCD) tem sido utilizada com bastante sucesso em animais e seres humanos para o diagnóstico qualitativo dos casos de toxicose por aldicarb (CAZENAVE et al., 2005; XAVIER et al., 2007). Similarmente ao Temik[®], existem outros praguicidas granulares no mercado, tais como os carbamatos carbofurano e carbosulfan e os organofosforados cadusafós, dissulfoton, forato e terbufós; porém, eles diferem quanto ao aspecto macroscópico e particularidades cromatográficas (CAZENAVE et al., 2005). Além da CCD, o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também pode ser útil na identificação e quantificação do aldicarb em diversas amostras biológicas (GUIMARAES et al., 2005; MELITO, 2004)

2.3 Alterações anatomo-histopatológicas encontradas nas intoxicações pelo aldicarb

Apesar da ocorrência freqüente de intoxicação por aldicarb em animais, há poucos relatos na literatura que descrevem as alterações macro- e microscópicas encontradas nos animais expostos.

Grendon, Frost e Baum (1997) citaram a ocorrência de alterações *post mortem* compatíveis com quadro de hipóxia aguda em ovelhas, com presença de espuma em vias aérea superiores (alterações observadas em 8 das 9 ovelhas necropsiadas). Ainda em ovelhas que vieram a óbito após intoxicação pelo aldicarb, os achados foram semelhantes, incluindo o edema pulmonar e grande quantidade de espuma em traquéia em todos animais necropsiados (4 animais) e, microscopicamente, a presença de severo

edema alveolar agudo difuso em todos os animais avaliados (3 animais) (DORMAN et al., 1992).

Remetendo também às alterações pulmonares, Lobo Jr. (2003) destaca a ocorrência de hemorragia à necropsia de cães, além do achado do agente tóxico em meio ao conteúdo gástrico dos animais. Dorman et al. (1992) atentam para a ocorrência comum de edema pulmonar nas intoxicações pelo aldicarb.

Em intoxicação experimental pelo aldicarb em cabras (0,25 mg/kg, dose única, via oral), foram encontrados, ao exame necroscópico, congestão cerebral moderada, hemorragia, edema e congestão pulmonar discretos, cianose de mucosas, congestão e hemorragia cardíaca, hepática, abomasal e intestinal discretas, rins com congestão e hemorragia moderadas, enterite moderada e sinais de erosões em abomaso. As alterações histopatológicas encontradas (em grau discreto) foram vacuolização citoplasmática e necrose centrolobular dos hepatócitos, congestão hepática predominante em zona três, enterite catarral e nefrose (degeneração e necrose tubular renal, presença de cilindros, corpúsculos renais retraídos ou necróticos). Ao exame dos fragmentos pulmonares, foram observados hemorragia alveolar, edema e enfisema e congestão dos capilares alveolares (MOHAMED; ADAM, 1990).

Em vacas leiteiras que vieram a óbito após exposição ao aldicarb, observou-se, ao exame necroscópico, a presença de edema pulmonar e, ao exame histopatológico, as lesões associadas a intoxicação foram áreas de hemorragia alveolar e edema discreto (KERR et al., 1991).

Frazier et al. (1999) relataram que, em 162 casos de intoxicação por aldicarb em diferentes espécies animais, nenhuma alteração macroscópica foi relacionada a este agente e que apenas alterações patológicas incidentais foram encontradas em alguns animais.

Verster et al. (2004) apontam que as alterações *post mortem* da intoxicação por carbamatos, de forma geral, são inespecíficas, incluindo congestão e cianose, ruptura bronquiolar, edema e enfisema pulmonar, presença de petéquias em alguns órgãos, pancreatite e enterite em cães e miopatia dos músculos intercostais e diafragmáticos nos casos severos.

Em nossos estudos preliminares (mestrado), foram avaliados 214 casos de cães e gatos que vieram a óbito após a exposição oral ao aldicarb (XAVIER, 2004). À necropsia, todos os animais apresentavam evidências deste agente tóxico em meio ao conteúdo estomacal (presença de granulações enegrecidas – figura 1G). Em alguns

animais, granulações também foram observadas em intestino (figura 1H) e/ou traquéia. Em cães, foram observadas alterações macroscópicas nos pulmões (89,4%), fígado (65,5%), rins (41,6%), intestino (38,9%), baço (28,3%), cérebro (27,4%), pâncreas (15,0%), coração (8,8%), timo (7,1%) e bexiga (1,8%). Em gatos, foram encontradas alterações macroscópicas nos pulmões (93,1%), fígado (62,4%), rins (45,5%), intestino (30,7%), cérebro (14,8%), baço (12,9%), pâncreas (8,9%), coração (7,9%), timo (3,9%) e bexiga (0,9%). Assim, considerando-se as duas espécies estudadas, as alterações mais freqüentes foram encontradas nos pulmões (91,1%), fígado (64,0%) e rins (43,4%).

Nos pulmões, a principal alteração macroscópica encontrada foi a hemorragia pulmonar, tanto em cães (69,0%), como em gatos (78,2%), sendo que o padrão mais freqüente foi a hemorragia distribuída em múltiplos focos pela superfície pulmonar (19,1% - figura 1A), seguida da hemorragia generalizada (3,7%) e da focal (1,4%). Nos cães, em segundo lugar, observou-se a ocorrência de edema pulmonar (61,0%), seguido da congestão (58,4% - figura 1B); já em felinos, foi observada congestão (59,4% - figura 1A) e, em terceiro lugar, o edema pulmonar (55,4%). Em ambas as espécies, em relação à intensidade destas alterações, foram observadas mais comumente a hemorragia (37,8%) e edema discretos (27,1%), congestão discreta (22,9%) ou severa (23,3%).

Ainda considerando o sistema respiratório, foram encontradas também alterações em traquéia, incluindo a presença de petéquias, alimento e principalmente espuma branca, decorrente do edema pulmonar. O hemotórax (4,4%) e o hidrotórax (3,5%) em cães foram mais freqüentes que em gatos; já o enfisema pulmonar foi mais freqüente em gatos (4,9%), que em cães. A alteração menos comum foi a atelectasia, com um caso em um felino.

O segundo órgão mais acometido por alterações macroscópicas, em ambas as espécies, foi o fígado. A congestão foi a alteração mais referida (52,8% - Figura 1C e D), seguida do padrão lobular (5,6%) e dos sinais de degeneração hepática (5,1%). Ainda, foram citadas a presença de hemorragia (3,3%), hepatomegalia (2,8%), superfície rendilhada (0,9%) e necrose multifocal (0,5%).

Nos rins, a congestão também foi a alteração mais freqüente (40,6% - Figura 1E e F), sendo citada, em alguns casos, a presença de hemorragia e de nefrose.

Figura 1 – Fotomacrografias de cães (B, D, F e G – canino, Pinscher, F, adulta) e gatos (A, C, E – felino, sem raça definida, macho, adulto; H – felino, sem raça definida, fêmea, 3 anos) que vieram a óbito após a intoxicação por aldicarb. A) congestão e hemorragia severa pulmonar; B) congestão pulmonar severa; C e D) congestão hepática severa; E e F) congestão renal bilateral severa; G e H) grânulos enegrecidos do praguicida em conteúdo estomacal e em porção terminal de duodeno, respectivamente. Departamento de Patologia, FMVZ/USP

2.4 Respostas teciduais a injúrias externas: alterações circulatórias

Entre as perturbações circulatórias que podem estar associadas aos casos de intoxicação pelo aldicarb, estão o edema, a congestão, a hemorragia e o choque.

A ocorrência de congestão depende de distúrbio na circulação venosa, estando a sua patogenia associada a uma alteração local (trombose) ou compressão venosa e, principalmente, a disfunções envolvendo o órgão central da circulação, o coração (NETTO; SANTOS; MONTENEGRO, 2006). Tais distúrbios na circulação venosa, que podem ser agudos ou crônicos, levam a ocorrência de estase sanguínea, a qual promove, entre outras alterações, a ocorrência de edema, hemorragia e de hipóxia, a qual leva, por sua vez, aos processos degenerativos ou a morte celular.

O fígado é um dos órgãos mais afetados pelo aumento da pressão hidrostática e pela diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo causada pela congestão, havendo o desenvolvimento de hipóxia ao redor da veia centrolobular (ou vênula hepática terminal - zona 3) e a degeneração ou morte dos hepatócitos próximos a esta região (THOMSON, 1983). Em relação ao pulmão, a congestão é freqüentemente causada por distúrbios no funcionamento cardíaco, com estagnação do sangue nos vasos pulmonares, levando ao edema e a saída de eritrócitos do interior dos vasos (LÓPEZ, 1998).

A hemorragia é a saída do sangue do interior dos vasos, podendo ser decorrente de fatores extrínsecos, como traumas e lesões às células endoteliais, fatores intrínsecos ao organismo, como estados hipertensivos, aneurismas e coagulopatias (NETTO; SANTOS; MONTENEGRO, 2006), ou mesmo ser resultante do aumento da pressão hidrostática venosa e saída das hemácias através da parede vascular intacta, na chamada diapedese. Microscopicamente, as hemácias são claramente visíveis fora dos vasos, podendo permanecer por vários dias até serem removidas por lise ou fagocitose (THOMSON, 1983). Com freqüência, a congestão passiva está associada à hemorragia causada pela ruptura de capilares (JONES; HUNT; KING, 2000).

O edema constitui o aumento da quantidade de líquido intersticial dos tecidos e cavidades, o qual, quando rico em proteínas, cora-se em róseo nas colorações pela hematoxilina e eosina (CHEVILLE, 1994; NETTO; SANTOS; MONTENEGRO, 2006). Muitas vezes, microscopicamente, o edema pulmonar não pode ser confirmado em virtude da perda de líquidos durante a fixação do tecido em solução contendo formol

e porque o líquido contendo baixo conteúdo em proteínas é fracamente corado (LÓPEZ, 1998).

O edema pulmonar pode ser decorrente da lesão tóxica direta na parede capilar (edema pulmonar de permeabilidade) ou por aumento da pressão hidrostática/decréscimo da pressão osmótica (edema pulmonar hemodinâmico), nas condições onde há dificuldade no retorno venoso (distúrbios cardíacos) e nos casos de hipoproteinemia (CHEVILLE, 1994; JONES; LÓPEZ, 1998; HUNT; KING, 2000). Nos casos de injúria pulmonar aguda, a ocorrência do edema se faz marcadamente pelo aumento da permeabilidade endotelial (MANIATIS; ORFANOS, 2008).

Tal como nos distúrbios da circulação venosa, a ocorrência do choque implica em alterações progressivas na perfusão sanguínea dos tecidos. O choque é o resultado da incapacidade generalizada do sistema circulatório em perfundir adequadamente as células com oxigênio e nutrientes, sendo caracterizado por uma hipotensão significativa (JONES; HUNT; KING, 2000).

Entre as causas de choque, destacam-se a diminuição ou obstrução do fluxo sanguíneo (hipovolemias e trombos), a vasodilatação periférica (endotoxemias) e a redução acentuada do débito cardíaco (como observado nas arritmias), as quais podem ser induzidas por diversos tipos de injúrias. Muitas vezes, um conjunto de alterações clínicas que não causam diretamente o choque, pode aumentar os mecanismos que promovem o colapso circulatório (CHEVILLE, 1994).

Neste sentido, nos casos graves de exposição ao aldicarb, bem como de outros anticolinesterásicos, onde há grande prejuízo das funções cardiorrespiratórias, a evolução dos sinais clínicos para o quadro de choque é um evento possível e que deve ser considerado na terapêutica das intoxicações. Tal resultado se dá principalmente pelos efeitos sobre o coração (bradicardia e bloqueio atrioventricular) e hipotensão (OLSON, 1999).

As lesões teciduais do choque são o resultado da hipóxia, consequência da circulação periférica inadequada pela diminuição do débito cardíaco (CHEVILLE, 1994; JONES; HUNT; KING, 2000). As consequências do colapso circulatório nos diversos tecidos incluem a congestão e o edema pulmonar, a acidose metabólica, a hemorragia e necrose do miocárdio, a degeneração e necrose dos túbulos renais e dos hepatócitos, principalmente localizados na região centrolobular (zona 3) e a degeneração gordurosa hepática (NETTO; SANTOS; MONTENEGRO, 2006).

2.5 Respostas celulares a injúrias externas: alterações reversíveis (degenerativas) e irreversíveis (morte celular)

Pelas respostas celulares observadas nos estudos de microscopia de animais intoxicados pelo aldicarb, no presente trabalho, destacamos neste item, a degeneração hidrópica e gordurosa, bem como os processos de morte celular por necrose e apoptose.

O ambiente em que vivem os organismos varia a cada instante, gerando estímulos que irão provocar diferentes graus de respostas adaptativas. Quando tais estímulos ultrapassam a capacidade de resposta celular, como ocorre, por exemplo, em uma intoxicação grave, passam a representar agressões ou causas externas de doenças (PEREIRA, 2006), as quais alteram o equilíbrio celular. Em resposta a esta quebra na homeostase, as células podem se adaptar, sofrer um processo regressivo ou morrer (MYERS; MCGAVIN, 2007).

Agentes químicos exógenos induzem a lesão celular por meio de dois mecanismos, sendo um deles de forma direta, causando alteração nas membranas celulares ou à capacidade celular de geração de energia, necessárias para a manutenção da homeostasia celular e o outro mecanismo indireto, com a transformação em metabólitos mais reativos, causando degeneração e morte celular (JONES; HUNT; KING, 2000).

Independente do mecanismo de ação tóxica, nos casos em que a célula agredida não está adaptada, ela apresentará uma alteração regressiva, ou seja, uma degeneração ou lesão reversível (CHEVILLE, 1994; FABRIS, 2006). Uma célula degenerada apresenta-se entre os limites da normalidade e da morte celular, a qual irá ocorrer quando as alterações celulares atingirem o chamado ponto do não retorno, tornando-se a lesão de caráter irreversível.

Sabe-se que, quando uma célula apresenta sua função diminuída, uma série de substâncias oriundas de seu metabolismo alterado podem acumular-se dentro ou fora da célula, como ocorre com a água (inchação turva ou hidrópica, tumefação celular, degeneração hidrópica ou edema celular), lipídeos (degeneração gordurosa, infiltração ou metamorfose gordurosa, esteatose ou lipidose), carboidratos (degeneração glicogênica), entre outras (FABRIS, 2006).

A degeneração hidrópica ocorre em função de um comprometimento da regulação do volume celular, um processo baseado no controle das concentrações de

sódio e de potássio no citoplasma realizado pela bomba Na^+/K^+ da membrana celular, a qual funciona com a atividade da enzima ATPase retirando o sódio do citoplasma, com gasto de ATP. Sendo assim, qualquer estímulo externo que promova a alteração da membrana citoplasmática, da bomba Na^+/K^+ ou da produção de energia, pode causar o acúmulo de sódio no interior da célula, do potássio fora da mesma, o que, na tentativa de manter o equilíbrio isosmótico, leva ao aumento da água no citoplasma, promovendo a tumefação celular (FABRIS, 2006; MYERS; MCGAVIN, 2007). O estímulo clássico para a ocorrência deste tipo de lesão é a hipóxia (JONES; HUNT; KING, 2000).

O edema celular constitui resposta mais comum, imediata e a mais importante às agressões celulares tóxicas e ocorre frequentemente em órgãos com alta atividade metabólica, como o fígado e os rins (THOMSON, 1983; CHEVILLE, 1994).

Assim, o edema celular caracteriza-se pelo acúmulo de água no citoplasma, que se torna volumoso, diluído, pálido, com núcleo normalmente posicionado, sendo mais comumente observado em células parenquimatosas, como as do fígado e rins (THOMSON, 1983; FABRIS, 2006). Macroscopicamente, o órgão apresenta-se pálido, aumentado de volume e peso e, microscopicamente, as células apresentam-se com vacúolos de diversos tamanhos e claros. À microscopia eletrônica, a célula apresenta mitocôndrias dilatadas, vesiculosas, com desestruturação das suas cristas. Podem surgir densidades amorfas ricas em fosfolipídeos (FABRIS, 2006), demonstrando desarranjo no metabolismo celular. Por isso, a degeneração hidrópica deve ser diferenciada da degeneração gordurosa e da glicogênica por meio de técnicas histoquímicas (THOMSON, 1983).

Com o avançar do processo, outras organelas podem também se intumescer e ocorrer a dispersão dos ribossomos, com a queda na síntese protéica e perda da basofilia celular. Apesar de todas estas alterações, a tumefação celular corresponde a uma alteração reversível e, uma vez retirado o estímulo que a desencadeou, a célula retorna ao seu normal sem que haja a ocorrência de outros transtornos funcionais mais graves (FABRIS, 2006).

Entre as causas da degeneração hidrópica, estão quaisquer estímulos que interfiram na fosforilação oxidativa (processo que gera ATP), como a carência de oxigênio (hipóxia - principal causa da degeneração hidrópica), a falta de substratos e a ação de diversos agentes tóxicos (CHEVILLE, 1994; FABRIS, 2006). Além destas causas, a tumefação celular também pode ser resultante de agressões à membrana celular, tais como por substâncias químicas e toxinas bacterianas, bem como da ação de

soluções hipertônicas introduzidas no organismo e a perda acentuada de eletrólitos, como ocorre nos estados de vômitos e diarreias severas (FABRIS, 2006).

A degeneração gordurosa corresponde ao acúmulo de lipídeos neutros (triglicerídeos) no citoplasma das células parenquimatosas. É comumente observada em hepatócitos, por estar o fígado diretamente relacionado ao metabolismo de gorduras, e menos freqüentemente no miocárdio e no epitélio tubular renal (JONES; HUNT; KING, 2000; FABRIS, 2006). Macroscopicamente, o órgão apresenta-se aumentado de peso e volume, amarelado e com bordos arredondados. Microscopicamente, a degeneração gordurosa apresenta-se como pequenos vacúolos no citoplasma (microgoticular) que, com a evolução do processo, tendem a se coalescer, formando grandes vacúolos (macrogoticular) que rechaçam o núcleo para a periferia e dão ao citoplasma uma aparência espumosa (THOMSON, 1983).

Para a identificação deste tipo de degeneração, os cortes histológicos devem ser obtidos a partir de fragmentos de tecido fresco, congelados ou conservados em solução aquosa de formol e corados pelo *sudan black* ou *oil-red-O* (*sudan III*) (TOLOSA et al., 2003; FABRIS, 2006).

Para a ocorrência deste tipo de lesão, basta haver um agente agressor ou estímulo que seja capaz de alterar qualquer um dos passos do metabolismo lipídico, ou seja, que cause um desequilíbrio no fornecimento, na utilização, na síntese ou na liberação dos lipídeos da célula. O excesso de lipídeos na célula sugere, portanto, a elevação persistente do nível de lipídeos sangüíneos, a inibição de enzimas metabolizadoras de lipídeos pela hipóxia crônica, a injúria tóxica subletal aguda que suprime as vias lipídicas ou a presença de doença metabólica crônica (CHEVILLE, 1994).

Como ocorre na tumefação celular, a retirada do estímulo lesivo permite que a célula com degeneração gordurosa recupere a sua homeostase rapidamente. Entretanto, em casos graves e crônicos, pode haver a morte do hepatócito e a ocorrência de alterações funcionais severas e irreversíveis no fígado, como é observado na cirrose hepática (FABRIS, 2006).

Sendo assim, as alterações celulares irreversíveis ocorrem quando a agressão é suficientemente grave, impedindo o retorno da integridade bioquímica, funcional e morfológica, fazendo com que ocorra a progressão das lesões até a morte celular. É importante ressaltar, entretanto, que as diferentes causas de lesão irreversível podem não ser o resultado de um estímulo lesivo a um único sistema ou a uma organela, mas

serem o resultado de alterações bioquímicas que acabam por ultrapassar o limiar de adaptação da célula. Neste sentido, passando o “ponto de não retorno”, a morte celular, sob o ponto de vista morfológico e bioquímico, poderá ocorrer pela chamada morte celular accidental ou necrose ou pela morte celular programada ou apoptose (RAFFRAY; COHEN, 1997; JONES; HUNT; KING, 2000).

Entre os mecanismos que levam à morte celular, estão a diminuição da produção de energia, como ocorre nos casos de hipóxia, nas alterações de membranas celulares e pela ação de radicais livres (principalmente os derivados do oxigênio) e de metabólitos tóxicos. Estes estímulos levam a queda da fosforilação oxidativa, com conseqüente queda na produção de ATP, que altera todos os mecanismos celulares dependentes de energia. Entre estes, estão a parada da bomba de Na^+/K^+ , que além de causar o edema celular, também leva ao acúmulo de cálcio no citoplasma, aumentando ainda mais o gradiente osmótico no interior da célula e favorecendo a ativação das fosfolipases, que degradam os lipídeos de membrana, bem como das nucleases, que penetram no núcleo fragmentado e degradam a cromatina. Assim, há a desestruturação das organelas, dispersão dos ribossomos e, tardiamente, dos lisossomos, que liberam as enzimas hidrolases e promovem a degradação dos componentes celulares (FABRIS, 2006).

Os aspectos da necrose que possam ser identificáveis em células individuais levam de 6 a 18 horas após a morte da célula para que possam ser visualizadas. Entre as características microscópicas mais marcantes da célula necrótica, estão as alterações nucleares, que são a condensação da cromatina nuclear (picnose), a fragmentação do núcleo (cariorrhexia) e a dissolução da cromatina nuclear (cariólise), bem como o aumento da acidofilia ou lise do citoplasma (THOMSON, 1983; CHEVILLE, 1994; JONES; HUNT; KING, 2000).

A avaliação da morte celular pode ser realizada por meio da citometria de fluxo. Como visto anteriormente, o processo de morte celular por necrose envolve a desestruturação das membranas celulares. O corante iodeto de propídeo, o qual não penetra em membranas íntegras, pode ser utilizado na identificação das células mortas, as quais, com a penetração daquele marcador, passam a emitir fluorescência vermelha, um diferencial na identificação das células pela citometria (VERMES et al., 1995).

Durante muitos anos, acreditou-se que a morte induzida quimicamente nos tecidos se fazia primariamente por meio dos mecanismos de morte celular descritos anteriormente (necrose) (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003). Diversos estudos mostram que, na verdade, a morte das células pode ser decorrente também do processo de

apoptose (RAFFRAY; COHEN, 1997) e que, na maioria das vezes, ele é o principal responsável pela injúria celular (FELDMANN, 1997).

A apoptose é um tipo peculiar de morte celular caracterizada por diversos aspectos morfológicos e bioquímicos que a diferem da morte celular por necrose. A apoptose ocorre em fenômenos fisiológicos diversos, renovando e regulando o número de células em tecidos adultos, mas também presente após a exposição a agentes químicos, os quais podem simultaneamente causar a necrose em diversos tecidos animais, incluindo o fígado (FELDMANN, 1997; PAGLIARA et al., 2003).

A apoptose é um fenômeno que ocorre rapidamente, e o evento total não dura mais que poucas horas (VERMES et al., 1995). No fígado de ratos, a duração deste processo tem sido calculada como sendo de cerca de 3 horas (BURSCH et al., 1990) e, em condições normais, hepatócitos apoptóticos podem ser encontrados na proporção de 1-5/10.000 hepatócitos normais (FELDMANN, 1997; PAGLIARA et al., 2003).

A morte celular programada resulta da ativação e transcrição de genes específicos (“genes suicidas”), diferentemente da necrose, cuja ocorrência depende da ação de fatores externos. Além disso, ao contrário deste tipo de morte celular, em que freqüentemente grande número de células é afetado em um tecido, a apoptose tende a afetar células individualizadas de um tipo específico, sugerindo existir limiares diferentes entre as células para a ocorrência da morte celular programada, bem como haver uma relação entre a gravidade da injúria/dose exposição e o tipo de morte celular envolvido (RAFFRAY; COHEN, 1997; JONES; HUNT; KING, 2000).

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos através de receptores específicos na superfície celular chamados receptores da morte ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Estas diferentes vias culminam com a ativação de proteases (conhecidas como caspases), presentes no citosol, que têm papel fundamental no processo de morte celular. Tais enzimas apresentam seletividade a alguns tipos de substratos, como proteínas envolvidas no reparo de danos e na replicação do DNA, no ciclo celular, na sinalização de transdução e na manutenção da integridade da estrutura celular (PAROLIN; REASON, 2001).

A lesão do DNA, alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento representam sinais de estresse intracelular que culminam com a disfunção mitocondrial. Estes estímulos fazem com que haja a translocação de proteínas

pró-apoptóticas para esta organela que, por sua vez, libera no citosol o citocromo-c, resultando na ativação das caspases (PAROLIN; REASON, 2001).

Morfologicamente, o processo de apoptose inicia-se com a condensação do núcleo e do citoplasma, com conseqüente redução do volume celular. Ocorre aglomeração densa da cromatina em massas em forma de meia-lua, seguindo-se a fragmentação do núcleo e da célula (corpúsculos apoptóticos), os quais podem ser fagocitados pelas células adjacentes ou por macrófagos (KERR, WYLLIE; CURRIE, 1972; VAUX, 2002). As bombas de sódio e potássio e as membranas celulares não são inicialmente afetadas e as organelas permanecem funcionais, inclusive dentro dos corpúsculos apoptóticos (JONES; HUNT; KING, 2000; PAGLIARA et al., 2003; FADEEL; ORRENIUS, 2005). Além disso, não há a formação de resposta inflamatória nem de fibrose após a morte celular, como pode ser observada na necrose (VERMES et al., 1995; FELDMANN, 1997; PAGLIARA et al., 2003).

Uma das alterações que ocorrem durante os estágios iniciais e intermediários da apoptose é a translocação da fosfatidilserina, um lipídeo presente na superfície interna da membrana celular, para o exterior da célula (GONÇALVES et al., 2006). Além da externalização da fosfatidilserina, existem outros aspectos definitivos da apoptose, como a perda do potencial de membrana mitocondrial, a liberação do citocromo-c, a condensação nuclear e a ativação de caspases (FADEEL; ORRENIUS, 2005). Todas estas alterações podem ser estudadas na avaliação da citotoxicidade de compostos, por meio de diversos métodos, como a citometria de fluxo (VERMES et al., 1995; GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003; NISHIMURA et al., 2006).

A externalização da fosfatidilserina pode ser avaliada com a utilização do fluorocromo conjugado anexina V, o qual se liga àquele lipídeo de membrana (JIA; MISRA, 2007). Esta avaliação, conjugada com a utilização do iodeto de propídeo, permite, então, a diferenciação entre as células vivas (negativas para anexina e iodeto de propídeo), apoptóticas (positivas para anexina) e necróticas (positivas para iodeto de propídeo) (VERMES et al., 1995; PAGLIARA et al., 2003; LORA et al., 2004; GONÇALVES et al., 2006; JIA; MISRA, 2007).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

A seguir, serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos do presente trabalho.

3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações *post mortem* microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos e compará-las com aquelas encontradas em camundongos experimentalmente expostos a esse praguicida, além de realizar o acompanhamento da evolução clínica e dos efeitos nocivos decorrentes desta exposição aguda experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar as alterações *post mortem* microscópicas encontradas em 100 casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos recebidos em um serviço de necropsopia, comparando os achados encontrados nas duas espécies, quanto à intensidade das alterações, órgãos afetados e faixa etária;
- Avaliar o quadro de intoxicação aguda experimental induzida por aldicarb em camundongos, sob o ponto de vista clínico (latência, sinais clínicos, ganho de peso, consumo de água e ração), laboratorial (hemograma e bioquímica sérica) e imunológico (peso relativo dos órgãos e celularidade de baço e medula), durante o período de até 14 dias após a exposição;
- Avaliar as alterações microscópicas induzidas pela intoxicação experimental causada pelo aldicarb em camundongos por meio da microscopia óptica, microscopia eletrônica e histoquímica;
- Avaliar os efeitos do aldicarb na indução da apoptose/necrose de hepatócitos *in vivo* e *in vitro* e de leucócitos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Serão apresentados a seguir, os materiais e os métodos utilizados no estudo das alterações *post mortem* microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos, bem como aqueles empregados na intoxicação experimental por este praguicida em camundongos.

4.1 Estudo das alterações *post mortem* microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos

Os dados sobre casuística, critérios de inclusão, histopatologia, documentação fotográfica e análise estatística usados para o estudo das alterações *post mortem* microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos serão apresentados a seguir.

4.1.1 Casuística

Foi feito um estudo, de caráter observacional e retrospectivo (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1996), no qual avaliou-se lâminas contendo os cortes histológicos de 100 casos de intoxicação fatal por aldicarb em cães e gatos encaminhados para o Serviço de Necropsia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), durante o período de sete anos (1999-2005). Estes animais eram provenientes do Hospital Veterinário da FMVZ/USP ou de origem externa, oriundos de outras instituições particulares (clínicas e hospitais veterinários, laboratórios etc.) ou trazidos pelos próprios proprietários.

As lâminas avaliadas neste estudo continham fragmentos de órgãos coletados durante a necropsia, os quais foram conservados em solução de formol 10% e encaminhados para o Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP. As lâminas foram confeccionadas e coradas pela técnica de hematoxilina-

eosina. A avaliação histopatológica foi feita com a supervisão do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

4.1.2 Critérios de inclusão

Selecionaram-se os casos que preencheram os seguintes critérios:

- Presença de indícios macroscópicos (granulações enegrecidas) do aldicarb no trato digestivo;
- Laudo necroscópico registrando como *causa mortis* a intoxicação exógena pelo aldicarb;
- Resultado positivo na análise toxicológica. A metodologia analítica empregada para a confirmação dos casos de intoxicação por aldicarb foi a cromatografia em camada delgada (CCD) em amostras de conteúdo estomacal, desenvolvida anteriormente no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP (XAVIER et al., 2007).

4.1.3 Histopatologia

O estudo das lesões foi realizado em amostras de tecidos provenientes de ambas as espécies animais e para cada espécie em separado, sendo os casos divididos em quatro grupos, de acordo com a faixa etária: G1 – filhotes (0 – 1 ano); G2 – adultos jovens (1,1 – 4 anos); G3 – adultos (4,1 – 7 anos) e G4 – idosos (mais de 7,1 anos).

A avaliação dos tecidos provenientes de diversos órgãos (coração, pulmões, fígado, baço, pâncreas, intestino delgado, rins e encéfalo) foi realizada por meio de microscopia óptica (microscópio Nikon – Binocular), com aumentos de 40, 100, 200 e 400x. A intensidade das alterações observadas nos cães e gatos foi classificada inicialmente por meio da utilização de escores, considerando a porcentagem de campos (total de 10 campos aleatórios com aumento de 400x) apresentando alterações, da seguinte forma (VAILATI, 2001): ausente = 0 (%); discreto = + (até 20%); moderado = ++ (até 50%) e severo = +++ (mais de 50%). Posteriormente, para as principais alterações histopatológicas encontradas, essa graduação utilizada foi substituída por escores (0, 1, 2, 3, respectivamente) para a realização da análise estatística (comparação

entre as faixas etárias e espécies). Foram desprezadas as alterações decorrentes de processos crônicos, senis, autolíticos e infecciosos.

4.1.4 *Documentação fotográfica*

As fotomicrografias foram obtidas através de um sistema de análises de imagens computadorizado, composto por um microscópio óptico acoplado a uma câmera de vídeo e um computador (microscópio Nikon Eclipse E800, acoplado a uma câmera Nikon FDX-35), que possui uma placa digitalizadora e o programa de análise de imagens (Image Proplus).

4.2 **Intoxicação experimental por aldicarb (Temik[®]) em camundongos**

A intoxicação experimental por aldicarb em camundongos foi realizada com o objetivo de comparar, numa situação controlada, as alterações microscópicas encontradas nessa espécie animal, com aquelas observadas em cães e gatos intoxicados, em condições naturais, com este praguicida. Tais estudos visaram também acompanhar a evolução clínica e avaliar os efeitos nocivos decorrentes da intoxicação aguda grave causada pelo carbamato aldicarb, imediatamente após a intoxicação e por um período de até 14 dias.

4.2.1 *Animais*

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, com idade variando de 50 a 60 dias e peso corporal, no início dos experimentos, entre 25 e 35 g. Esses animais eram provenientes do Biotério Central do Departamento de Patologia da FMVZ/USP e foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório desse Departamento e da Comissão de Bioética da FMVZ/USP (processo número 921/2006).

Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, medindo 30 x 19 x 12 cm, providas de aço galvanizado (5 camundongos por caixa), sendo forradas com maravalha autoclavada. Essas caixas foram mantidas em sala com temperatura e umidade aproximadamente constantes (entre 24 – 26 °C e 65 - 70 %, respectivamente), por meio de aparelhos de ar condicionado, ventilação e sistema de exaustão. A iluminação artificial foi fornecida em um ciclo de claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 6:00 horas.

Água filtrada e ração comercial foram fornecidas *ad libitum* aos animais, os quais foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo 7 dias antes do início de cada experimento. No dia dos experimentos, todos os animais foram pesados para controle de peso e para o cálculo dos volumes das drogas a serem administradas, de acordo com as doses preconizadas nos experimentos.

4.2.2 Drogas, reagentes e soluções

- **Aldicarb (Bayer Crop Science):** padrão técnico (pureza de 99,7%), usado nos ensaios *in vitro*.
- **Anexina V-FITC (Laboratório Amarante-Mendes):** corante específico utilizado para verificar a apoptose, por meio da citometria de fluxo.
- **Azul de Tripán (Merck):** para avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer.
- **EDTA [ácido etilenodiamina tetra-acético (Sigma)]:** utilizado como anticoagulante na coleta de sangue para hemograma.
- **CaCl₂. 6H₂O [cloreto de cálcio hexa-hidratado (Sigma)]:** utilizado no preparo do tampão de ligação usado na avaliação da morte celular/apoptose por citometria de fluxo.
- **Cetamina 5% (Vetanarcol[®], Laboratório König):** anestésico geral utilizado em associação com a xilazina.
- **Glutaraldeído 25% (Nuclear):** utilizado no preparo do fixador para a microscopia eletrônica.
- **Heparina 25.000 UI/5ml (Liquemine[®], Roche):** anticoagulante utilizado imediatamente antes do procedimento de perfusão.

- **Hepes (Gibco):** utilizado no preparo do tampão de ligação usado na avaliação da morte celular/apoptose por citometria de fluxo.
- **H₂O₂ [peróxido de hidrogênio 30% (Merck)]:** utilizado na avaliação da morte celular/apoptose de leucócitos por citometria.
- **Iodeto de propídeo [PI (Sigma)]:** fluorocromo empregado na técnica de citometria de fluxo para avaliação da viabilidade celular.
- **Isocelm (Celm):** utilizado na contagem de leucócitos e hemácias.
- **KCl [cloreto de potássio (Sigma)]:** utilizado no preparo do tampão de ligação usado na avaliação da morte celular/apoptose por citometria de fluxo.
- **KH₂PO₄ [fosfato de potássio monobásico (Labsynth)]:** utilizado no preparo do tampão para a microscopia eletrônica.
- **Kits para bioquímica (Celm):**
 - Albumina (ALB)
 - Alanina-aminotransferase (ALT)
 - Aspartato-aminotransferase (AST)
 - Colesterol (COL)
 - Creatinina (CR)
 - Fosfatase alcalina (FA)
 - Gama-glutamilttransferase (GGT)
 - Glicose (GLI)
 - Proteína total (PT)
 - Triglicerídeos (TRI)
 - Uréia (UR)
- **Kits para a avaliação da função pancreática (Bioclin):** amilase e lipase.
- **Lisocelm (Celm):** solução lisante de hemácias utilizada na determinação do hematócrito.
- **MgCL₂. 2H₂O [cloreto de magnésio di-hidratado (Sigma)]:** utilizado no preparo do tampão de ligação usado na avaliação da morte celular/apoptose por citometria de fluxo.
- **NaCL [cloreto de sódio (Sigma)]:** utilizado no preparo da solução salina e no preparo do tampão de ligação usado na avaliação da morte celular/apoptose por citometria de fluxo.

- **Na₂HPO₄.7H₂O [fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado (Labsynth)]:** utilizado no preparo do tampão para a microscopia eletrônica.
- **PBS [*phosphate-buffered saline* (pH=7,2-7,4)]:** solução tamponada com fosfato utilizada na perfusão para microscopia eletrônica e avaliação da morte celular/apoptose por citometria de fluxo.
- **RPMI 1640 (Gibco):** meio de cultura celular.
- **Solução salina (NaCl) a 0,2%:** empregada como solução de lise de hemácias, previamente à cultura dos leucócitos para a avaliação da morte celular/apoptose por citometria de fluxo.
- **Solução salina (NaCl) a 0,9%:** empregada como veículo de diluição dos anestésicos.
- **Solução salina (NaCl) a 1,6%:** empregada como solução de lise de hemácias, previamente à cultura dos leucócitos para a avaliação da morte celular/apoptose por citometria de fluxo.
- **Soro Fetal Bovino (Gibco):** nutriente empregado para o enriquecimento do RPMI.
- **Temik 150[®] (Bayer Crop Science):** 15% p/p, peso molecular 190,3 (Lote 002-08-2800).
- **Xilazina 2% (Dopaser[®], Laboratório Calier):** relaxante muscular utilizado em associação com a cetamina na anestesia dos animais.

4.2.3 Preparo das soluções

Aldicarb

A partir do produto comercial Temik 150[®], foram preparadas as soluções usadas na intoxicação experimental e na avaliação *in vitro* da morte celular/apoptose de leucócitos sanguíneos e de hepatócitos. Nos testes *in vitro*, foram preparadas também soluções de aldicarb a partir do padrão técnico.

Para a intoxicação experimental, foram preparadas soluções contendo 0,01% de aldicarb, diluindo-se 20 mg do produto comercial em 30 ml de água destilada, imediatamente antes da sua utilização.

Para os estudos *in vitro*, foi preparada uma solução mãe contendo 5.000 μM de aldicarb (0,95 mg de aldicarb padrão técnico/ml de PBS 1x ou 6,3 mg de Temik®/ml de PBS 1x) e, a partir de diluições seriadas em PBS 1x, foram obtidas as soluções de aldicarb, 500 μM , 50 μM , 5 μM e 0,5 μM utilizadas no ensaios.

EDTA 3mM

Para o preparo desta solução, 1,12 g de EDTA foram diluídos em 1.000 ml de PBS (1x). O preparo desta solução foi realizado sempre no dia do experimento.

Glutaraldeído 2,5%

Para o preparo de 1.000 ml, empregou-se:

- Glutaraldeído 25%	80 ml
- Água Milli-Q	420 ml
- Tampão fosfato	500 ml

Esta solução foi mantida congelada (-20°C) até o momento do uso.

Iodeto de propídeo (PI - 100 $\mu\text{g/ml}$)

Diluir 1 mg de iodeto de propídeo em 10 ml de PBS 1x. Aliquotar em *eppendorfs* e armazenar a - 20 °C, ao abrigo da luz, até o momento do uso.

PBS – (*phosphate-buffered saline* com pH = 7,2-7,4) – solução estoque 10x concentrada

Contém:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma®)	42,96 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma®)	3,6 g
- NaCL (Sigma®)	82,0 g
- H_2O destilada q.s.p.	1.000 ml

PBS 1x

Solução obtida a partir de 100 ml da solução estoque de PBS (10x concentrada) com volume final ajustado para 1.000ml de H_2O destilada.

Solução anestésica

Foram diluídos 2 ml de Cetamina (Vetanercol® - 50 mg/ml) e 0,5 ml de xilazina (Dopazer® - 20 mg/ml) em 7,5 ml de solução salina 0,9%, imediatamente antes do uso. Os animais receberam o volume correspondente a 10 ml/kg de peso corporal.

Solução salina 0,2%, 1,6% e 0,9%

Para as respectivas soluções foram diluídos em 1.000 ml de H₂O destilada 2,0 g, 16,0 g e 9,0 g de NaCl. Após o preparo, as soluções foram mantidas em geladeira (4°C).

Tampão de ligação

Para o preparo de 1.000 ml:

- 10 mM Hepes (pH 7,4)	2,38 g
- 150 mM NaCl	8,60 g
- 5mM KCl	0,37 g
- 1mM MgCl ₂ .6H ₂ O	0,20 g
- 1,8 mM CaCl ₂ .2H ₂ O	0,26 g
- Água milli-q	1.000 ml

Armazenar a - 20°C até o momento do uso.

Tampão fosfato 0,2M (pH 7,2 a 7,4)

Para o preparo de 1.000 ml:

- KH ₂ PO ₄	7,62 g
- Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	38,60 g
- Água milli-q	1000 ml

Armazenar a - 20°C até o momento do uso.

Rosenfeld

Para o preparo de 1.000 ml:

- Giemsa	0,97 g
- May Grunwald	0,53 g
- Metanol	1.000 ml

Colocar os componentes lentamente em frasco âmbar, diluindo em metanol. Agitar por 24 horas. Manter em temperatura ambiente por até 30 dias após o preparo.

4.2.4 Métodos

Serão apresentados a seguir os métodos utilizados no estudo da intoxicação experimental por aldicarb em camundongos.

4.2.4.1 Determinação da dose a ser utilizada nos experimentos

Para a escolha da dose a ser utilizada nos experimentos, os camundongos foram expostos a doses decrescentes de Temik®, baseadas na DL₅₀ oral de camundongos que é de 0,30 a 1,50 mg/kg de peso vivo (GUIMARAES et al., 2005; WEXLER, 1998). Para tanto, cada grupo de três camundongos foi exposto a uma das seguintes doses: 1,0; 0,7; 0,5; 0,3; 0,1; 0,09; 0,08 e 0,07 mg/kg. Foram avaliados o tempo para o aparecimento dos sinais da intoxicação, a intensidade dos mesmos, a taxa de morbidade e de mortalidade. A dose escolhida foi aquela capaz de promover sintomatologia clínica grave, porém, com a recuperação espontânea do animal e baixa mortalidade (até um animal por grupo).

4.2.4.2 Observações clínicas

Foi utilizado o teste observacional descrito por Irwin (1968) para realização do *screening* toxicológico; através deste teste, pode-se ter uma rápida idéia da toxicidade do composto testado, seus principais efeitos, a duração de seu efeito, além de permitir uma estimativa das doses a serem usadas nos testes subseqüentes.

Os animais dos grupos tratados com o Temik® foram observados durante 12 horas consecutivas após a exposição, a fim de ser verificada a presença ou não dos seguintes sinais de intoxicação: mortalidade, apatia, excitação, piloereção, salivação, miose, tremores e fasciculações musculares, convulsões, reatividade ao toque, incoordenação motora e apatia. Cada sinal foi avaliado separadamente, observando-se os comportamentos espontâneos de cada camundongo em uma caixa moradia.

Fragmentos de diversos órgãos (encéfalo, coração, pulmões, fígado, baço, intestino delgado, pâncreas, rins) foram coletados daqueles animais que vieram a óbito logo após a exposição, sendo fixados por imersão em formol 10% para avaliação histopatológica (coloração de hematoxilina-eosina). O processamento do material e a montagem das lâminas foram realizados no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

4.2.4.3 Avaliação do ganho de peso, do consumo de ração e de água

Os camundongos foram pesados antes da exposição ao Temik® para a distribuição estatisticamente homogênea dos grupos. O consumo de ração e de água, bem como o peso dos animais foram medidos nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 14 após a exposição ao pragucida.

4.2.4.4 Estudo das alterações teciduais microscópicas e ultraestruturais

O estudo das alterações teciduais microscópicas e ultraestruturais foi realizado por meio da microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e histoquímica, os quais serão abordados a seguir.

4.2.4.4.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

Para a análise microscópica, os diversos órgãos (encéfalo, coração, pulmões, fígado, baço, intestino delgado, pâncreas, rins) foram coletados imediatamente após o óbito ou eutanásia dos animais e fixados por imersão em formol 10% por, no mínimo,

48 horas antes do processamento. Após este período, os fragmentos foram cortados em pequenos blocos com aproximadamente 1 cm³, quando então foram submetidos a procedimento usual de inclusão em parafina. Então, foram realizados cortes longitudinais e transversais de 5 µ de espessura e as lâminas foram devidamente montadas e coradas com hematoxilina-eosina para análise em microscópio. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

A avaliação histológica contou com a colaboração do Prof. Dr. Paulo César Maiorka e do Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, ambos do Departamento de Patologia da FMVZ/USP. O exame histológico das lâminas foi realizado em microscópio de luz com aumentos de 40, 100, 200 e 400x. As alterações teciduais foram avaliadas qualitativamente quanto à presença de distúrbios circulatórios e degenerativos. A intensidade das alterações foi classificada inicialmente por meio da utilização de escores, considerando a porcentagem de campos (total de 10 campos aleatórios com aumento de 400x) apresentando as lesões, da seguinte forma (VAILATI, 2001): ausente = 0 (%); discreto = + (até 20%); moderado = ++ (até 50%) e severo = +++ (mais de 50%). Posteriormente, para as principais alterações microscópicas encontradas, essa graduação foi substituída por escores (0, 1, 2, 3, respectivamente) para a realização da análise estatística.

As fotomicrografias foram obtidas através de um sistema de análises de imagens computadorizado, composto por um microscópio óptico acoplado a uma câmera de vídeo e um computador (microscópio Nikon Eclipse E800, acoplado a uma câmera Nikon FDX-35), que possui uma placa digitalizadora e o programa de análise de imagens (Image Proplus).

4.2.4.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fragmentos de aproximadamente 3 mm³ do fígado e rins foram removidos após perfusão sistêmica dos animais com o fixador glutaraldeído 2,5%, com tampão fosfato 0,2 M, e mantidos no mesmo fixador, em refrigeração, até o processamento. Para a perfusão, os camundongos foram profundamente anestesiados com uma associação de cetamina e xilazina e receberam, por via intraperitoneal, uma dose única de heparina de 0,1 ml, a fim de evitar a formação de coágulos intravasculares durante o procedimento.

Em seguida, a cavidade torácica foi aberta e uma cânula de perfusão foi inserida no ventrículo esquerdo. Por meio de uma bomba de perfusão, foram perfundidos 100 ml de solução salina tamponada (PBS 0,1 M) e, em seguida, 300 ml da solução do fixador. Imediatamente após, os órgãos de interesse foram retirados, sendo mantidos no mesmo fixador, em refrigeração, por no mínimo 24 horas.

O processamento dos tecidos foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP). Durante este processo, as peças foram fixadas novamente em glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4), por 24 horas, e pós-fixadas em solução tamponada de tetróxido de ósmio 2% com sacarose 10,56%, durante 24 horas. Seguiu-se a desidratação em série crescente de álcoois, do 70% até o absoluto, por 15 minutos em cada concentração de álcool, sendo passado no álcool absoluto por quatro vezes. As peças foram, então, imersas em óxido de propileno, por 30 minutos, duas vezes consecutivas, e, em seguida, em uma mistura de óxido de propileno e resina Spurr (1:1), durante 12 horas, à temperatura ambiente.

As resinas empregadas para microscopia eletrônica de transmissão apresentam alta viscosidade, devendo-se a infiltração nos tecidos ocorrer de forma progressiva, através de diluições gradativas no solvente intermediário, o óxido de propileno (MOTOYAMA, 2004).

As peças foram incluídas em resina Spurr por 1 hora, a 37 °C, colocadas em moldes de silicone e polimerizadas em estufa, a 60 °C, durante 36 horas. Em seguida, os blocos foram trimados e obtidos cortes semi-finos seriados, de 0,5 µm, com a faca de vidro em ultramicrotomo Leica Ultracut (Reichert & Jung, Germany). Estes cortes foram coletados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina para escolha das áreas de interesse, por meio da microscopia de luz. Após esta seleção, os blocos foram novamente trimados e os cortes ultrafinos de 70-80 nm de espessura foram feitos utilizando-se uma faca de diamante, sendo os cortes coletados em telas e contrastados com metais pesados (solução de acetato de uranila 4% e citrato de chumbo) (MOTOYAMA, 2004). As telas foram analisadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEM-1010 do Departamento de Microscopia Eletrônica do ICB/USP.

4.2.4.4.3 HISTOQUÍMICA

- Reação histoquímica para glicogênio: fragmentos de fígado foram coletados após a eutanásia dos camundongos e mantidos em solução de formol a 10% para posterior processamento e coloração por PAS (ácido periódico de Schiff). Os vacúolos de glicogênio são destacados em vermelho (TOLOSA et al., 2003).
- Reação histoquímica para gordura: fragmentos de fígado foram coletados após a eutanásia dos camundongos e foram congelados imediatamente após a retirada, em nitrogênio líquido. Após este processo, os fragmentos foram mantidos em *freezer* à -80°C até o momento do processamento. A coloração utilizada foi o *sudan black*, que cora em preto os lipídeos (TOLOSA et al., 2003).

As colorações histoquímicas para o glicogênio e para a gordura foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP). As fotomicrografias foram obtidas através do mesmo sistema de análises de imagens computadorizado descrito anteriormente no item 4.2.4.4.1.

4.2.4.5 Hemograma

Hemácias, hemoglobina e leucócitos

Após anestesia dos animais com cetamina e xilazina, o sangue foi coletado do plexo infraorbitário com auxílio de uma pipeta *Pasteur* lavada previamente com anticoagulante (EDTA). O número de hemácias ($\text{He} - \times 10^6/\mu\text{l}$), o número de leucócitos ($\text{Leu} - \times 10^3/\mu\text{l}$) e a dosagem de hemoglobina ($\text{Hg} - \text{g/dl}$) foram determinados por meio de sistema automático, utilizando-se os equipamentos Diluidor DA-500 CELM[®] e CC-530 CELM[®] de uso veterinário.

Hematócrito ou volume globular

A determinação do hematócrito (%) – (Ht) foi feita por meio da técnica do micro-hematócrito. Após a homogeneização da amostra de sangue, colhida com EDTA, $\frac{3}{4}$ de um tubo de micro-hematócrito foi preenchido com sangue, sendo a extremidade sem sangue fechada com massa de modelar. O tubo foi centrifugado em microcentrifugador (modelo 241, Fanem[®]), durante 5 minutos (10.000 rpm), e a leitura feita em cartão especial para este fim (GARCIA-NAVARRO, 2005).

Índices hematimétricos ou eritrocitários

A partir dos dados anteriores, foram calculados os índices hematimétricos (LASSEN; WEISER, 2007):

- Volume corpuscular médio (VCM): é o volume médio ocupado pelas hemácias, também chamado de índice de tamanho ou de volume. É expresso em fentolitros (fl).

$$\text{VCM} = \text{Ht} \times 10/\text{He}$$

- Hemoglobina corpuscular média (HCM): é o conteúdo hemoglobínico de cada hemácia, expresso em picogramas (pg).

$$\text{HCM} = \text{Hb} \times 10/\text{He}$$

- Concentração hemoglobínica corpuscular média ou índice de saturação (CHCM): é a saturação média de Hb em cada hemácia. É expresso em percentual.

$$\text{CHCM} = \text{Hb}/\text{Ht} \times 100$$

Contagem diferencial dos leucócitos

Para a obtenção da fórmula leucocitária, foram preparados esfregaços de sangue periférico, feitos das amostras colhidas para o hemograma. Após a secagem da lâmina,

foi adicionado o corante Rosenfeld, durante 3-5 minutos e, em seguida, sem derramar o corante, o mesmo volume de água destilada, deixando agir durante 15 minutos. A lâmina foi, então, lavada em água corrente, esfregando-se um algodão na sua parte não corada.

Os esfregaços foram examinados ao microscópio óptico, com objetiva de imersão a óleo (100x), anotando-se o tipo de cada um dos leucócitos encontrados (neutrófilos, linfócitos, monócitos, basófilos e eosinófilos), contando-se um total de 100 células. Assim, ao final da contagem, obteve-se a fórmula leucocitária ou número relativo (%) e o número absoluto de leucócitos por mm^3 de sangue (GARCIA-NAVARRO, 2005).

4.2.4.6 Bioquímica sérica

Após anestesia dos camundongos com cetamina e xilazina, o sangue foi coletado sem anticoagulante, por meio de punção cardíaca, e foi mantido em temperatura ambiente até a formação de coágulo (cerca de 45 minutos), quando, então, foi centrifugado a 4.000 rpm, durante 10 minutos (centrífuga Harrier 18/80, Sanyo®). Em seguida, o soro obtido foi aliquotado, identificado e mantido congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

Foram avaliadas:

a. função hepática:

- Testes de enzimas séricas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamilttransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA);
- Testes funcionais: substâncias produzidas - proteínas totais (PT), albumina (ALB), uréia (UR), glicose (GLI); substâncias do metabolismo lipídico – triglicerídeos (TRI) e colesterol (COL).

b. função renal: uréia (UR) e creatinina (CR);

c. função pancreática exócrina: atividade sérica das enzimas pancreáticas amilase e lipase;

d. lesão muscular esquelética cardíaca: níveis séricos da enzima creatina cinase – fração Mb (CK-Mb).

A avaliação da função hepática e renal foi realizada com kits comerciais Celm, utilizando-se equipamento autoanalisador CELM SBA-200[®]. A função pancreática foi analisada por meio de teste colorimétrico (Bioclin[®]) específico para cada enzima, utilizando-se um espectrofotômetro. Baseando-se na estabilidade das enzimas avaliadas, estes testes foram realizados no máximo 21 dias após a coleta do soro;

4.2.4.7 Avaliação do peso relativo de timo, baço e fígado, celularidade de baço e avaliação histológica dos órgãos linfóides

Imediatamente após a eutanásia dos animais, por meio de anestesia profunda com cetamina e xilazina, procederam-se as coletas do timo, baço e fígado para o cálculo de peso relativo (calculado dividindo-se o peso do órgão pelo peso do animal e multiplicando-se por 100) e avaliação da celularidade do baço. Para prosseguir a esta avaliação, um fragmento do baço foi friccionado entre duas lâminas e lavado com 5 ml de meio RPMI a 4°C. A seguir, esta suspensão de células foi centrifugada a 1.200 rpm, durante 8 minutos, ressuspensa em 1 ml de água destilada (para lise das hemácias) e, após 20 segundos, o volume foi completado com 9 ml de PBS 1x. A contagem foi feita em câmara de Neubauer (diluição 1:10 em azul de tripan).

4.2.4.8 Avaliação global das células da medula óssea

As células da medula óssea foram obtidas da cavidade femoral direita de cada animal, por meio da lavagem da mesma com 5,0 ml de solução gelada de RPMI (pH 7,4), após o corte das epífises, com auxílio de seringa agulhada (30G). As células foram acondicionadas em tubos de poliestireno e dispersas com auxílio de pipeta *Pasteur*, até a obtenção de uma suspensão celular homogênea. A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram realizadas em câmara de Neubauer (diluição 1:10 em azul de tripan).

4.2.4.9 Quantificação dos corpúsculos apoptóticos hepáticos

Os corpúsculos apoptóticos foram quantificados em lâminas histológicas de fígado, coradas com hematoxilina e eosina, sob a lâmpada de fluorescência, de acordo com Stinchcombe et al. (1995). O método baseia-se no fato de que os corpúsculos apoptóticos, que correspondem a porções eosinofílicas remanescentes de células apoptóticas, podem ser identificados neste tipo de corte histológico porque a eosina apresenta alta sensibilidade à fluorescência. Para tanto, foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse E800, acoplado a uma câmera Nikon FDX-35 e a uma lâmpada de fluorescência (lâmpada de mercúrio – *Super high pressure mercury lamp ower supply*, Nikon). Antes desta mensuração, o território de interesse foi localizado, procedendo-se, em seqüência, o congelamento da imagem (figura 48) e a sua mensuração, feita com o *software* Image ProPlus®, utilizando-se calibragem para Nikon 0,5x. Em seguida, todos os corpúsculos apoptóticos foram contados e o resultado dividido pela área do fragmento. A confirmação de cada corpúsculo foi feita por microscopia de luz, comparando-se com as imagens obtidas na fluorescência. Toda a avaliação dos corpúsculos apoptóticos foi feita com magnificação 400x. A quantificação foi feita por meio da relação entre o número de corpúsculos apoptóticos e a área do fragmento selecionado.

4.2.4.10 Avaliação *in vitro* da morte de leucócitos por necrose/apoptose

Colheita, quantificação e teste de viabilidade dos leucócitos sangüíneos

Após anestesia profunda com solução de cetamina e xilazina, o sangue foi coletado por meio de seringa com heparina, pela via intracardíaca, sendo reunidas em um único *pool*. Seguiu-se a lise das hemácias, por meio da solução salina 0,2%, por 20 segundos, e a adição de mesmo volume de solução salina 1,6%, sendo submetido à centrifugação a 1.400 rpm, durante 7 minutos (centrífuga Sanyo–Harrier 18/80®). Esse procedimento foi realizado duas vezes para a completa lise das hemácias e, após a segunda centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI (GIBCO®) com 5% de soro fetal bovino (SFB - GIBCO®) para a contagem de células e quantificação da viabilidade celular. Para isto, 10 µl dessa suspensão celular foram transferidos para um

ependorff e acrescentados 10 µl de azul de tripan. A quantificação do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico (Nikon – binocular), sendo contadas as células contidas nos quatro quadrantes externos, ou quadrados “brancos”. As células que adquiriram a coloração azul pelo azul de tripan foram consideradas como inviáveis. O número de células presentes na suspensão foi ajustado para 1×10^5 de leucócitos/mL. Somente foram utilizadas suspensões celulares com viabilidade superior a 90%.

Exposição das células ao praguicida

Foram colocados 100 µL da suspensão de leucócitos em cada um dos seguintes tubos: branco, controle negativo, controle apoptose, controle necrose e tubos contendo o padrão do aldicarb ou diferentes concentrações do produto comercial Temik®.

Nos tubos branco, controle negativo e controle necrose, foi adicionado apenas o meio (RPMI com 5% de SFB) até completar o volume de 1 mL. No tubo controle positivo para apoptose, foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3 µM e o meio até completar o volume de 1 mL. No restante dos tubos, foram adicionados 100 µL da solução de aldicarb padrão ou do produto comercial Temik®, de forma a obter as concentrações finais de 50 µM, 5 µM, 0,5 µM ou 0,05 µM, sendo completado o volume de 1 mL com o meio. A seguir, todos os tubos foram incubados durante 12 horas, em estufa umidificada (ShelLab®) a 37⁰ C, com atmosfera de 5% de CO₂.

Marcação com anexina V-FITC (externalização de fosfatidilserina) e iodeto de propídeo (PI)

Para este procedimento, foram seguidas as seguintes etapas:

- a) Após incubação dos leucócitos em estufa (ShelLab®), durante 12 horas, a 37 °C e 5% de CO₂, os tubos foram centrifugados por 7 minutos, a 1.400 rpm (centrífuga Sanyo®–Harrier 18/80);
- b) O sobrenadante foi desprezado e adicionado 1 ml/tubo de tampão de ligação (10 mM Hepes/NaOH; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂; pH=7,4), sendo os tubos novamente centrifugados (7 minutos, 1.400 rpm);

c) Em seguida, os leucócitos foram ressuspensos em 100 μ l de tampão de ligação contendo anexina V previamente conjugada com FITC (1 μ g/mL), na diluição de 1:500; exceto o tubo branco, que recebeu apenas o tampão de ligação e o tubo controle necrose, que recebeu apenas o PI (15 μ g/ml), em volume de 40 μ l, na concentração de 100 μ g/ml de tampão de ligação. Todos os demais tubos (controle negativo, controle positivo, padrão aldicarb e Temik[®]) receberam marcação dupla com anexina V-FITC e PI;

d) A seguir, todos os tubos foram mantidos no escuro, à temperatura ambiente, por 15 minutos;

e) Após este período, adicionou-se em todos os tubos 1 mL de tampão de ligação, sendo então centrifugados por 7 minutos, a 1400 rpm;

f) O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 200 μ l de PBS 1x (solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato) a cada tubo, sendo feita a leitura em citômetro de fluxo.

Este procedimento contou com a colaboração da Dra. Cristina de Oliveira Massoco.

Leitura no citômetro de fluxo

Durante o processo de apoptose, a fosfatidilserina é externalizada, permitindo que a proteína anexina V se ligue especificamente a ela. Assim, para detectar o número de células em apoptose ou necrose, utilizou-se a técnica proposta por Vermes et al. (1995), que avalia a externalização da fosfatidilserina após a sua marcação com anexina V. O complexo anexina V-FITC liga-se preferencialmente a fosfolípidos carregados negativamente, como a fosfatidilserina. Esta marcação é feita pela combinação com o PI. As células vivas apresentam fluorescência para PI e anexina negativas; as células apoptóticas em estágio inicial são anexina positiva e PI negativa; as células necróticas são PI positivas e anexina negativas, enquanto as necróticas e apoptóticas em estágio tardio, ambos PI e anexina positivos. Para a avaliação destes resultados, observa-se a porcentagem de células que permanecem em um dos quatro quadrantes do *dot plot*, como ilustrado pela figura 2.

Figura 2 – A) Gráfico de pontos (*dot plot*); B) Esquema demonstrando a característica da célula que permanece em um dos quatro quadrantes do gráfico de pontos. UL – *uper left*; UR – *uper right*; LL – *low left*; LR - *low right*

A detecção das porcentagens de cada um dos quadrantes, as quais correspondem ao percentual de células viáveis, em apoptose, necrose ou em apoptose final/necrose, foi determinada em citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System[®], San Jose, CA, USA) acoplado a um computador (Macintosh Apple[®], CA, USA), utilizando-se o *software* Cell Quest Pro[®]. Em linhas gerais, populações celulares conduzidas através de um sistema fluídico contínuo são interceptadas por uma fonte luminosa a laser, gerada pela excitação de um laser argônio (488 nm de excitação). A transmissão ou a refração de luz pelas células é captada por meio de quatro detectores: *Forward Scatter* (FSC), o qual é sensível à dispersão frontal da luz; *Side Scatter* (SSC) o qual é sensível à dispersão lateral da luz, bem como dois detectores fluorescentes (FL1 e FL2). Os detectores FSC e SSC, que avaliam o tamanho e a complexidade interna da célula, respectivamente, foram ajustados para acomodar populações heterogêneas de células presentes na amostra. Para a avaliação celular, uma tensão de 100-200 V foi empregada para o FSC, com o objetivo de remover pequenas partículas, incluindo bactérias livres e restos celulares.

Populações celulares discretas foram, então, reconhecidas com base nos parâmetros FSC/SSC e registradas eletronicamente (*FAC – Scan*, Becton-Dickinson Immunocytometry Systems). A fluorescência da anexina V-FITC foi medida no canal FL1 (fluorescência verde – 530 ± 30 nm) e a do PI, em FL2 (fluorescência laranja-avermelhado – 585 ± 42 nm). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra e o gráfico de pontos (*dot plot*) foi analisado através do *Cell Quest software* (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, EUA).

Inicialmente, o aparelho foi calibrado com o tubo branco, como controle de fluorescência basal, e com os tubos controle apoptose e controle necrose. A figura 3 ilustra o esquema de análise da população de leucócitos do sangue periférico delimitada pelo *gate*, excluindo, assim, outros tipos celulares das amostras (*debris* celulares).

Após a obtenção das porcentagens de cada um dos quadrantes, foi realizada a análise estatística pela ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer para a comparação múltipla entre os diversos grupos analisados.

Figura 3 - Esquema ilustrativo de análise da morte celular (apoptose/necrose) de leucócitos por citometria de fluxo utilizando-se o *software Cell Quest Pro®*. A) Gráfico de *Side Scatter* (SSC) por *Forward Scatter* (FSC) (*dot plot*) com *gate* selecionando as populações celulares analisadas; B) Histograma da intensidade de fluorescência verde (anexina V) da população de leucócitos selecionada (neste caso, controle negativo de apoptose)

4.2.4.11 Avaliação *in vitro* da morte de hepatócitos por necrose/apoptose

Este experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Celular do ICB/USP e contou com a colaboração da Dra. Thaís Martins de Lima.

Cultivo das células HepG2

Para esta avaliação, foram utilizadas linhagens de hepatócitos derivadas de hepatoma humano HepG2 (ICB/USP), mantidas em meio D-MEM (pH 7,4) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, bicarbonato de sódio 44 mM, estreptomicina 10.000 U/mL e penicilina 10.000 U/mL. As placas foram mantidas em estufa umidificada a 37⁰ C, com atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana e as células foram tripsinizadas (solução de tripsina 0,2% e versene 0,02%) e subcultivadas uma vez por semana.

Exposição das células ao praguicida

A cada placa contendo 5 x 10⁵ hepatócitos, foi adicionada a solução de aldicarb padrão ou do produto comercial Temik[®], de forma a obter as seguintes concentrações finais: 500 µM, 50 µM ou 5 µM. As placas foram incubadas durante 24 horas, nas mesmas condições utilizadas para o cultivo celular.

Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI)

Após a incubação, o meio de cultura foi retirado com auxílio de uma pipeta, sendo adicionados 300 µl de tripsina filtrada. A placa foi, então, incubada em estufa a 37⁰ C, durante 3 minutos. Em seguida, o mesmo meio de cultura foi devolvido a cada uma das placas e o volume total coletado em tubos para centrifugação (1.200 rpm, 10 minutos). As células foram ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação (Binding Buffer – 10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) do Kit *Annexin V-FITC* (Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA, Estados Unidos). Foram adicionados 0,2 µL de anexina V conjugada com fluoresceína (anexina V-FITC 20µg/mL em Tris-NaCl) e incubados por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. Posteriormente, o volume foi acertado para 300 µl com tampão de ligação; 30 µL de PI foi adicionado nas

amostras e estas foram analisadas por citometria de fluxo, conforme descrito anteriormente.

Leitura no citômetro de fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System[®], San Jose, CA, USA) acoplado a um computador (Macintosh Apple[®], CA, EUA), utilizando-se o *software Cell Quest Pro*[®]. Os parâmetros utilizados foram os mesmos descritos anteriormente para a avaliação da morte celular/necrose de leucócitos. Dez mil eventos foram adquiridos por amostra e o gráfico de pontos (*dot plot*) foi analisado através do *Cell Quest software* (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, EUA).

4.3 Análise estatística

Análise descritiva: para variáveis qualitativas, a análise foi realizada através da distribuição de frequência absoluta e relativa (porcentagem).

Análise comparativa: todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa GraphPad InsTat, versão 3.0 para Mac OS, sendo as diferenças consideradas significantes quando $p \leq 0,05$. Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram todos representados pela média $\pm$ desvio padrão. Os seguintes testes foram utilizados: teste de Bartlett (paramétricos x não paramétricos); teste *t* de Student (para dados paramétricos, comparando-se a média de dois grupos); ANOVA (para dados paramétricos), seguida do teste de Tukey – Kramer de comparações múltiplas (identificação das diferenças entre as médias de três ou mais grupos).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Serão apresentados a seguir, o delineamento experimental e os resultados obtidos no estudo das alterações *post mortem* microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos, bem como aqueles da intoxicação experimental por este praguicida em camundongos.

5.1 Estudo das alterações *post mortem* microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos

Os itens a seguir mostram os resultados obtidos no estudo da casuística e das alterações histopatológica de cães e gatos intoxicados por aldicarb.

5.1.1 Casuística

Considerando-se os critérios de inclusão descritos no item 4.1.2, foram selecionados 100 casos de intoxicação por aldicarb em cães (N = 50) e gatos (N = 50) para a avaliação histopatológica dos órgãos coletados durante a necropsia. As características da população estudada estão apresentadas na tabela 1, sendo o grupo G1 representado por animais com idades de até 1 ano (filhotes); G2, entre 1,1 a 5 anos (adultos jovens); G3, entre 5,1 a 7 anos (adultos) e G4, com mais de 7,1 anos de vida (idosos).

Quanto ao sexo e definição racial, foram avaliadas proporções equivalentes em cães, sendo a maioria deles representada por animais do grupo G1 e G2 (filhotes – 30% e adultos jovens – 38%). Os casos selecionados em gatos eram na maioria fêmeas (62%), adultos jovens (56%) e sem definição racial (92%). Considerando-se ambas as espécies, os casos estudados apresentaram distribuição de frequência semelhante para o sexo (45% machos e 55% de fêmeas), sendo a maioria composta por adultos jovens (47%) ou filhotes (32%), sem definição racial (70%).

Tabela 1 – Distribuição (número e respectiva porcentagem) das características dos cães e gatos intoxicados por aldicarb utilizados no estudo das alterações *post mortem* microscópicas quanto ao sexo, idade e raça (SRD = sem raça definida; CRD = com raça definida). N= número de animais

	Cães (N = 50)	Gatos (N = 50)	Total (N = 100)
Sexo			
Macho	26 (52%)	19 (38%)	45 (45%)
Fêmea	24 (48%)	31 (62%)	55 (55%)
Idade			
G1 (até 1 ano)	15 (30%)	17 (34%)	32 (32%)
G2 (1,1 a 5 anos)	19 (38%)	28 (56%)	47 (47%)
G3 (5,1 a 7 anos)	7 (14%)	3 (6%)	10 (10%)
G4 (mais de 7,1 anos)	9 (18%)	2 (4%)	11 (11%)
Raça			
SRD	24 (48%)	46 (92%)	70 (70%)
CRD	26 (52%) ^b	4 (8%) ^a	30 (30%)

^a 3 Siameses e 1 Persa; ^b 4 Poodles, 4 Cocker Spaniels, 3 Yorkshires, 2 Rottweilers, 2 Beagles, 2 Boxers, 2 Pinchers e, com um representante cada, as raças Dachshund, Pastor Alemão, Fox Paulistinha, Fila Brasileiro, Dog Alemão, Lhasa Apso e Labrador

5.1.2 Alterações histopatológicas

Na avaliação histopatológica dos cães, os principais órgãos acometidos foram os pulmões, o fígado e os rins, embora alterações tenham sido encontradas também no cérebro, cerebelo, pâncreas, coração, baço, timo, intestino delgado, linfonodos e estômago. Estes achados foram os mesmos para os gatos, excluindo-se o intestino e o estômago, onde nenhuma lesão foi encontrada. Todos os achados histopatológicos eram de natureza circulatória e/ou degenerativa, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição (número e respectiva porcentagem) das alterações microscópicas encontradas nos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos. N= número de animais

Órgão/alteração	Cães (N=50)	Gatos (N=50)	Total (N=100)
Pulmões			
Congestão	39 (78%)	44 (88%)	83 (83%)
Edema	31 (62%)	38 (76%)	69 (69%)
Hemorragia	37 (74%)	26 (52%)	63 (63%)
Enfisema	3 (6%)	5 (10%)	8 (8%)
Atelectasia	1 (2%)	1 (2%)	2 (2%)
Fígado			
Congestão	36 (72%)	43 (86%)	79 (79%)
Degeneração vacuolar	23 (46%)	23 (46%)	46 (46%)
Hemorragia	5 (10%)	2 (4%)	7 (7%)
Rins			
Congestão	32 (64%)	39 (78%)	71 (71%)
Hemorragia	13 (26%)	15 (30%)	28 (28%)
Nefrose	13 (26%)	7 (14%)	20 (20%)
Cérebro			
Congestão	17 (34%)	17 (34%)	34 (34%)
Hemorragia	2 (4%)	0	2 (2%)
Cerebelo			
Congestão	12 (24%)	3 (6%)	15 (15%)
Hemorragia	1 (2%)	0	1 (1%)
Pâncreas			
Congestão	7 (14%)	9 (18%)	16 (16%)
Hemorragia	10 (20%)	6 (12%)	16 (16%)
Baço			
Congestão	8 (16%)	7 (14%)	15 (15%)
Hemorragia	1 (2%)	2 (4%)	3 (3%)
Coração			
Congestão	9 (18%)	9 (18%)	18 (18%)
Hemorragia	2 (4%)	6 (12%)	8 (8%)
Timo			
Hemorragia	4 (8%)	2 (4%)	6 (6%)
Congestão	1 (2%)	0	1 (1%)
Intestino			
Congestão	4 (8%)	0	4 (4%)
Linfonodos			
Congestão	1 (2%)	1 (2%)	2 (2%)
Hemorragia	1 (2%)	0	1 (1%)
Estômago			
Congestão	2 (4%)	0	2 (2%)

A tabela 2 mostra as alterações *post mortem* microscópicas encontradas nos cães e gatos intoxicados por aldicarb. Nos pulmões de cães, as alterações encontradas foram congestão (78%), hemorragia (74%), edema (62%), além de enfisema pulmonar (6%) e atelectasia (2%, apenas um caso). No fígado, foi observado quadro congestivo (72%), além de degeneração vacuolar (46%) e hemorragia (10%). Congestão (64%), hemorragia (26%) e nefrose (26%) foram as alterações histológicas encontradas nos rins. Em cérebro, cerebelo, pâncreas, baço coração e linfonodos, foram encontradas congestão e hemorragia (4% e 2%, respectivamente). No intestino e no estômago, apenas congestão foi encontrada em poucos cães (8% e 4%, respectivamente).

Nos gatos, as alterações mais comuns nos pulmões foram congestão (88%), edema (69%) e hemorragia (52%), seguidas do enfisema pulmonar (10%). Atelectasia foi observada em um gato (2%). No fígado, a principal alteração encontrada foi congestão (86%) e degeneração vacuolar (46%). Hemorragia hepática foi encontrada em dois animais (4%). Nos rins, a alteração mais comum foi a congestão (78%), além da hemorragia (30%) e nefrose (14). Para os demais órgãos, assim como no cão, as alterações observadas foram de congestão e/ou hemorragia. Nenhum gato apresentou alterações histológicas no intestino e no estômago.

Considerando-se ambas as espécies, predominaram os achados em pulmões (congestão, edema e hemorragia), fígado (congestão e degeneração vacuolar), rins (congestão) e no cérebro (congestão). Com frequências semelhantes, foram encontradas alterações congestivas em cerebelo, pâncreas, baço e coração. Alterações histopatológicas menos frequentes foram observadas no timo, no intestino, nos linfonodos (apenas cães) e no estômago (apenas cães).

As figuras 4 a 8 ilustram algumas das alterações histopatológicas encontradas em cães e gatos intoxicados com aldicarb.

Erro!

Figura 4 – Fotomicrografias de pulmão. A) Cão, Boxer, fêmea, 2 anos: edema, congestão e hemorragia (HE, 100x); B) Cão, SRD, macho, 6 anos: edema, congestão e hemorragia intensos (HE, 100x); C) Cão, SRD, fêmea, 7 meses: edema e intensa congestão (HE, 100x); D) Gato, fêmea, 2 anos, SRD: edema e congestão pulmonares (HE, 200x); E) Gato, fêmea, 5 anos, SRD: edema, congestão e hemorragia intensa (HE, 100x); F) Gato, fêmea, 2 anos, SRD: congestão, hemorragia e edema intensos (HE, 100x)

Figura 5 – Fotomicrografias de fígado. A) Cão, fêmea, 6 meses, SRD: congestão intensa (HE, 40x); B e C) Cão, macho, 5 anos, SRD: congestão intensa (HE, 100x); D) Gato, fêmea, 3 anos, SRD: degeneração vacuolar evidente dos hepatócitos e congestão (HE, 100x); E) Gato, macho, 3 anos, Persa: congestão intensa em zona 3 (HE, 40x); F) Gato, fêmea, 2 anos, SRD: congestão moderada (HE, 100x)

Figura 6 – Fotomicrografias de rim. A) Cão, fêmea, 2 anos, Dogue Alemão: congestão, hemorragia, degeneração tubular (HE, 100x); B e C) Cão, fêmea, 2 anos, Boxer: congestão (HE, 100x); D) Gato, fêmea, 2 anos, SRD: congestão e hemorragia intratubular (200x); E) Gato fêmea, 5 anos, SRD: congestão, hemorragia e degeneração tubular (HE, 100x); F) Gato, macho, 3 anos, Persa: focos hemorrágicos (HE, 100x)

Figura 7 – Fotomicrografias: A) Coração, cão, fêmea, 6 meses, SRD: hemorragia subepicárdica; B) Coração, gato, fêmea, 2 anos, SRD: congestão

Erro!

Figura 8 – Fotomicrografias: A) Baço, cão, fêmea, 6 meses, SRD: congestão (HE, 100x); B) Pâncreas, cão, fêmea, 2 anos, Boxer: congestão (HE, 100x); C) Pâncreas, gato, fêmea, 5 anos, SRD: hemorragia. (HE, 100x)

A tabela 3 mostra as alterações microscópicas encontradas por faixa etária (filhotes, adultos jovens, adultos e idosos). Observa-se que, em filhotes (G1), congestão e edema pulmonares apareceram em proporções semelhantes em cães e em gatos, e hemorragia pulmonar em maior frequência em cães (22%, enquanto que, em gatos, foi de 12%). Da mesma forma, no fígado, congestão e degeneração vacuolar foram encontradas com a mesma frequência em ambas as espécies e a hemorragia hepática, embora em apenas três casos, foi observada exclusivamente na espécie canina. Os processos congestivos em cérebro, pâncreas, baço e coração, bem como hemorragia renal apareceram de forma mais frequente em gatos. Nefrose, entretanto, foi observada apenas em filhotes de cães. Nesta última espécie, congestão do cerebelo, do pâncreas e do estômago foram encontradas com maior frequência que na outra espécie estudada. Embora tenha sido observada em apenas dois cães, ressalta-se que a congestão estomacal foi observada apenas nesta faixa etária. Nenhuma alteração histológica foi observada no intestino e nos linfonodos dos animais desta idade.

Em adultos jovens (G2), hemorragia pulmonar foi encontrada com a mesma frequência em ambas as espécies, enquanto que congestão e edema pulmonares apareceram em frequências superiores na espécie felina, bem como apenas nesta foram encontrados enfisema e atelectasia. Ainda nesta espécie, foram mais frequentes os achados de congestão e degeneração hepática, congestão renal, pancreática e hemorragia cardíaca. Em cães, destacaram-se em relação aos gatos, nefrose, congestão cerebelar, hemorragia pancreática e congestão cardíaca. Em alguns caninos, encontrou-se congestão intestinal e alterações em linfonodos.

Em adultos (G3) e idosos (G4), a comparação entre os diversos tipos de alterações e entre as duas espécies ficou dificultada em virtude do baixo número de animais encontrado nestas faixas etárias e que foi utilizado na pesquisa. Nestes animais, observa-se que, como naqueles das demais idades, os principais órgãos acometidos foram, em ordem decrescente, os pulmões, o fígado e os rins e que, nestes, a frequência das alterações apareceu mais baixa que nas demais faixas etárias estudadas.

A tabela 4 apresenta as intensidades das alterações histopatológicas encontradas em cães, para cada uma das faixas etárias. Em pulmões, observa-se que predominaram as alterações intensas em filhotes e em adultos jovens, discretas em adultos e discretas e severas em idosos. No fígado, rins, cérebro e cerebelo de filhotes e de adultos jovens predominaram as lesões discretas. Em pâncreas de filhotes, fígado, rins e cérebro de adultos e em rins, cérebro, cerebelo e pâncreas de idosos foram encontradas as três

intensidades de alterações (isto é, discreta, moderada e severa) em freqüências semelhantes. No fígado de idosos as mais comuns foram as alterações severas. No baço e coração de filhotes, e no pâncreas de adultos, apenas lesões severas foram observadas, enquanto no timo e intestino de adultos jovens, apenas as discretas.

A tabela 5 apresenta a distribuição das freqüências de intensidades das alterações e faixas etárias de gatos intoxicados com aldicarb. De forma geral, nos filhotes e adultos jovens, pode-se observar que predominaram as alterações de intensidade discreta, com exceção dos rins em filhotes, onde foram classificadas com a mesma freqüência as lesões discretas e moderadas e, em adultos jovens, no mesmo órgão, as alterações discretas e as intensas foram as de maior freqüência. Ainda em adultos jovens, nota-se também que as alterações pulmonares moderadas e intensas foram encontradas com a mesma freqüência, sendo as mais comuns nestes animais. No pâncreas de animais deste grupo, as alterações nas três intensidades foram observadas com freqüências semelhantes. Nos dois últimos grupos (adultos e idosos) esta avaliação foi prejudicada pelo pequeno número de animais estudado; contudo, pode ser observado que nos pulmões dos adultos predominou o quadro severo.

Considerando-se cães e gatos em conjunto, foram escolhidos as principais alterações histopatológicas encontradas em pulmões (congestão, edema e hemorragia), fígado (congestão e degeneração vacuolar) e rins (congestão e hemorragia) para a análise semiquantitativa, de forma a verificar se havia alguma diferença estatisticamente significativa entre a intensidade das lesões das quatro faixas etárias. Observando-se a tabela 6 e a figura 9, nota-se que os animais idosos (G4) apresentaram o maior grau de intensidade da degeneração vacuolar hepática, sendo encontrada diferença significativa [$F(3,42)=4,513$; $p<0,01$) em relação aos adultos jovens (G2). Da mesma forma, a congestão renal foi mais intensa em adultos (G3), com diferença estatisticamente significativa [$F(3,69)=3,144$; $p<0,05$) do grupo de adultos jovens (G2).

Tabela 3 – Distribuição (número e respectiva porcentagem) das alterações *post mortem* microscópicas encontradas em cães e gatos intoxicados por aldicarb. São apresentados os valores de acordo com a faixa etária para cada espécie em separado e para ambas. N= número de animais

Órgão afetado	Faixa etária								
	G1 (até 1 ano)			G2 (1 a 5 anos)			G3 (5,1 a 7 anos)		
	Cães (N = 15)	Gatos (N = 17)	Total (N = 32)	Cães (N = 19)	Gatos (N = 28)	Total (N =47)	Cães (N = 7)	Gatos (N = 3)	Total (N =10)
Pulmões									
Congestão	10 (20%)	14 (28%)	24 (48%)	16 (32%)	25 (50%)	41 (82%)	6 (12%)	3 (6%)	9 (18%)
Edema	9 (18%)	9 (18%)	18 (36%)	12 (24%)	21 (42%)	33 (66%)	4 (8%)	2 (4%)	6 (12%)
Hemorragia	11 (22%)	6 (12%)	17 (34%)	15 (30%)	15 (30%)	30 (60%)	5 (10%)	3 (6%)	8 (16%)
Enfisema	0	1 (2%)	1 (2%)	0	2 (4%)	2 (4%)	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)
Atelectasia	0	0	0	0	1 (2%)	1 (2%)	1 (2%)	0	1 (2%)
Fígado									
Congestão	12 (24%)	14 (28%)	26 (52%)	13 (26%)	25 (50%)	38 (76%)	4 (8%)	2 (4%)	6 (12%)
Degeneração vacuolar	8 (16%)	5 (10%)	13 (26%)	8 (16%)	15 (30%)	23 (46%)	2 (4%)	2 (4%)	4 (8%)
Hemorragia	3 (6%)	0	3 (6%)	2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)	0	1 (2%)	1 (2%)
Rins									
Congestão	12 (24%)	15 (30%)	27 (54%)	14 (28%)	18 (36%)	32 (64%)	3 (6%)	4 (8%)	7 (14%)
Hemorragia	1 (2%)	5 (10%)	6 (12%)	9 (18%)	8 (16%)	17 (34%)	2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)
Nefrose	3 (6%)	0	3 (6%)	6 (12%)	4 (8%)	10 (20%)	2 (4%)	2 (4%)	4 (8%)
Cérebro									
Congestão	4 (8%)	8 (16%)	12 (24%)	8 (16%)	7 (14%)	15 (30%)	2 (4%)	2 (4%)	4 (8%)
Hemorragia	0	0	0	2 (4%)	0	2 (4%)	0	0	0
Cerebelo									
Congestão	3 (6%)	1 (2%)	4 (8%)	6 (12%)	1 (2%)	7 (14%)	0	1 (2%)	1 (2%)
Hemorragia	1 (2%)	0	1 (2%)	0	0	0	0	0	0
Pâncreas									
Congestão	4 (8%)	2 (4%)	6 (12%)	4 (8%)	6 (12%)	10 (20%)	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)
Hemorragia	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)	6 (12%)	3 (6%)	9 (18%)	2	2 (4%)	4 (8%)
Baço									
Congestão	1 (2%)	4 (8%)	5 (10%)	1 (2%)	2 (4%)	3 (6%)	2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)
Hemorragia	0	0	0	1 (2%)	2 (4%)	3 (6%)	1 (2%)	0	1 (2%)
Coração									
Congestão	2 (4%)	4 (8%)	6 (12%)	3 (6%)	1 (2%)	4 (8%)	2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)
Hemorragia	1 (2%)	3 (6%)	4 (8%)	1 (2%)	3 (6%)	4 (8%)	0	1 (2%)	1 (2%)
Timo									
Hemorragia	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)	2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)	0	0	0
Congestão	2 (4%)	0	2 (4%)	0	0	0	0	0	0
Intestino									
Congestão	0	0	0	4 (8%)	0	4 (8%)	0	0	0
Linfonodos									
Congestão	0	0	0	1 (2%)	0	1 (2%)	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	1 (2%)	0	1 (2%)	0	0	0
Estômago									
Congestão	2 (4%)	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 4 – Distribuição absoluta das alterações *post mortem* microscópicas encontradas em cães intoxicados por aldicarb. São apresentadas as intensidades das alterações encontradas (+ = discreta; ++ moderada; +++ = severa), de acordo com a faixa etária. N= número de animais

(Continua)

Órgão afetado	Faixa etária											
	G1 (até 1 ano) N = 15			G2 (1,1 a 5 anos) N = 19			G3 (entre 5,1 a 7 anos) N = 7			G4 (mais de 7,1 anos) N = 9		
	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Pulmões												
Congestão	2	0	8	3	3	10	2	2	2	2	3	2
Edema	1	0	8	6	2	4	2	1	1	1	1	4
Hemorragia	2	0	9	8	1	6	3	1	1	4	0	2
Enfisema	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
Atelectasia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
TOTAL	5	0	25	17	6	20	9	4	4	8	5	8
Fígado												
Congestão	8	0	4	4	1	8	1	1	2	1	2	4
Degeneração vacuolar	5	0	3	6	0	2	1	0	1	0	0	5
Hemorragia	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	15	0	8	12	1	10	2	1	3	1	2	9
Rins												
Congestão	6	0	6	11	2	1	0	1	2	1	2	1
Hemorragia	0	0	1	6	1	2	1	0	1	1	0	0
Nefrose	3	0	0	5	0	1	1	0	1	1	0	0
TOTAL	9	0	7	22	3	4	2	1	4	3	2	1
Cérebro												
Congestão	4	0	0	6	1	1	0	1	1	1	2	0
Hemorragia	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
TOTAL	4	0	0	7	1	2	0	1	1	1	2	0
Cerebelo												
Congestão	3	0	0	5	1	0	0	0	0	2	1	0
Hemorragia	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	4	0	0	5	1	0	0	0	0	2	1	0
Pâncreas												
Congestão	1	1	2	3	0	1	0	0	1	1	1	0
Hemorragia	1	0	0	4	0	2	0	0	2	1	0	0
TOTAL	2	1	2	7	0	3	0	0	3	2	1	0
Baço												
Congestão	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	3
Hemorragia	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	2				1	0	1	0	1	3
Coração												
Congestão	0	0	2	3	0	0	1	1	0	1	0	0

(Conclusão)

Órgão afetado	Faixa etária											
	G1 (até 1 ano) N = 15			G2 (1,1 a 5 anos) N = 19			G3 (entre 5,1 a 7 anos) N = 7			G4 (mais de 7,1 anos) N = 9		
	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Hemorragia	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	3	0	0	0	1	1	0	1	0	0
Timo												
Hemorragia	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Congestão	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Intestino												
Congestão	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfonodos												
Congestão	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0
Estômago												
Congestão	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 5 – Distribuição absoluta das alterações *post mortem* microscópicas encontradas em gatos intoxicados por aldicarb. São apresentadas as intensidades das alterações encontradas (+ = discreta; ++ moderada; +++ = severa), de acordo com a faixa etária. N= número de animais

Órgão afetado	Faixa etária											
	G1 (até 1 ano) N = 17			G2 (1,1 a 5 anos) N = 28			G3 (1 a 7 anos) N = 3			G4 (mais de 7,1 anos) N = 2		
	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Pulmões												
Congestão	3	7	4	4	11	10	0	1	2	0	1	1
Edema	4	5	4	4	8	9	0	0	2	0	1	1
Hemorragia	6	0	0	7	4	4	1	0	2	1	0	1
Enfisema	1	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0	0
Atelectasia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	3
TOTAL	14	12	8	18	23	23	1	2	6	4	4	6
Fígado												
Congestão	7	3	4	12	7	6	0	2	0	1	0	1
Degeneração vacuolar	4	0	1	13	1	1	1	0	1	1	0	0
Hemorragia	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
TOTAL	11	3	5	26	8	7	2	2	1	2	0	1
Rins												
Congestão	7	6	2	7	5	6	0	2	2	0	2	0
Hemorragia	2	3	0	5	2	1	1	0	0	1	0	0
Nefrose	0	0	0	2	0	2	2	0	0	1	0	0
TOTAL	9	9	2	14	7	9	3	2	2	2	2	0
Cérebro												
Congestão	6	2	0	5	2	0	1	1	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	6	2	0	5	2	0	1	1	0	0	0	0
Cerebelo												
Congestão	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Pâncreas												
Congestão	1	0	1	0	4	2	0	1	0	0	0	0
Hemorragia	1	0	0	3	0	0	1	0	1	0	0	0
TOTAL	2	0	1	3	4	2	1	1	1	0	0	0
Baço												
Congestão	2	1	1	0	0	2	0	1	0	0	1	0
Hemorragia	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
TOTAL	2	1	1	0	0	4	0	1	0	0	1	0
Coração												
Congestão	3	1	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0
Hemorragia	1	0	2	0	1	0	1	0	0	1	0	0
TOTAL	4	1	2	2	2	0	2	0	0	1	1	0
Timo												
Hemorragia	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Congestão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfonodos												
Congestão	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 6 - Análise microscópica semiquantitativa dos pulmões, fígado e rins de cães e gatos intoxicados por aldicarb, considerando a intensidade das alterações (escores: 0 = ausência, 1 = discreta, 2 = moderada e 3 = severa alteração) e a faixa etária. N= número de animais

Alteração	G1 (até 1 ano)	G2 (1,1 a 5 anos)	G3 (5,1 a 7 anos)	G4 (mais de 7,1 anos)
Pulmões				
Congestão	2,30 ± 0,80 N = 24	2,30 ± 0,75 N = 41	2,30 ± 0,83 N = 9	2,20 ± 0,80 N = 9
Edema	2,30 ± 0,84 N = 22	2,10 ± 0,85 N = 33	2,20 ± 0,90 N = 6	2,40 ± 0,80 N = 7
Hemorragia	2,06 ± 1,00 N = 17	1,83 ± 0,90 N = 30	1,90 ± 0,90 N = 9	1,75 ± 1,00 N = 8
Fígado				
Congestão	1,73 ± 0,90 N = 26	1,95 ± 0,90 N = 38	2,20 ± 0,75 N = 6	2,33 ± 0,86 N = 9
Degeneração vacuolar	1,60 ± 0,97 N = 13	1,30 ± 0,70 ^a N = 23	2,00 ± 1,15 N = 4	2,70 ± 0,80 N = 6
Rins				
Congestão	1,81 ± 0,90 N = 27	1,65 ± 0,83 ^b N = 32	2,62 ± 0,52 N = 8	2,00 ± 0,63 N = 6
Hemorragia	1,83 ± 0,75 N = 6	1,53 ± 0,80 N = 17	1,67 ± 1,15 N = 3	1,00 ± 0,00 N = 3

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: ^a p<0,01 em relação ao grupo G4; ^b p<0,05 em relação ao grupo G3

Figura 9 – Análise microscópica semiquantitativa (escores: 0 = ausência, 1 = discreta, 2 = moderada e 3 = severa alteração) da intensidade da degeneração hepática e da congestão renal em cães e gatos intoxicados pelo aldicarb, de acordo com a faixa etária. (G1 – até 1 ano; G2 - 1,1 a 5 anos; G3 - 5,1 a 7 anos e G4 - mais de 7,1 anos de vida). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: ** p<0,01 em relação ao grupo G4 e * p<0,05 em relação ao grupo G3

5.2 Intoxicação experimental por aldicarb (Temik®) em camundongos

Os itens a seguir mostram o delineamento experimental e os resultados obtidos no estudo da intoxicação por aldicarb em camundongos.

5.2.1 *Experimento 1: Determinação da dose tóxica a ser utilizada nos experimentos*

Foram utilizados camundongos Swiss, divididos ao acaso em grupos iguais de 3 animais cada. Os animais receberam por via oral (*gavage*), uma dose única de aldicarb (Temik®), por via oral, em uma das doses descritas no item 4.2.4.1, iniciando-se o teste a partir da dose correspondente a 1 mg/kg. Os animais do grupo controle receberam, pela mesma via, idêntico volume de água destilada. Os animais dos diferentes grupos foram observados até o óbito ou a recuperação dos sinais clínicos, sendo escolhida aquela dose capaz de promover intoxicação grave aguda, porém, com baixa mortalidade, conforme descrito no item 4.2.4.1.

Todas as doses testadas resultaram em mortalidade de 100 %, com exceção da dose de 0,08 mg/kg, que, apesar de promover sinais clássicos da intoxicação, apresentou mortalidade de 33 % (um animal). Esta foi, então, a dose escolhida para ser utilizada em todos os demais experimentos realizados *in vivo*. A dose de 0,07 mg/kg não promoveu nenhum óbito, apenas os sinais clínicos da intoxicação.

5.2.2 Experimento 2: Observações clínicas e histopatológicas da intoxicação por aldicarb (Temik®) em camundongos

Todas as doses testadas promoveram o aparecimento dos sinais clássicos da intoxicação por carbamatos, cuja latência para o início está mostrada na tabela 7 e na figura 10. Nota-se que houve diferença significativa no tempo para o início dos sinais clínicos entre os grupos que receberam as doses de 1,0 a 0,09 mg/kg e os animais que foram expostos às doses de 0,08 ou 0,07 mg/kg. Nestes últimos, a latência foi significativamente maior que nos demais [$F(7,16)=18,145$; $p<0,05$].

O quadro clínico da intoxicação iniciou-se com prostração, piloereção e sialorréia, evoluindo para excitação, tremores, fasciculações e incoordenação motora. Todos os animais apresentaram convulsões (um ou mais episódios) antes do óbito.

A tabela 7 mostra também a latência para a morte para os grupos que receberam de 1,0 a 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®); nenhum dos animais do grupo que recebeu 0,07 mg/kg morreu. A latência para o óbito do animal que recebeu a dose de 0,08 mg/kg foi significativamente maior que nos demais grupos [$F(6,13)=14,735$; $p<0,05$] – figura 11.

Os animais que receberam 0,08 ou 0,07 mg/kg não apresentaram convulsão, mas apresentaram todos os demais sinais clínicos, sendo que o tempo para a recuperação total desses animais variou de 45 minutos a 2 horas.

Durante a condução dos demais experimentos, realizados com a dose de 0,08 mg/kg, todos os sinais descritos acima foram observados de forma aguda após a exposição ao aldicarb; ressalta-se que nenhum sinal clínico ficou evidente durante a avaliação dos animais após 24 ou 48 horas e após 7 e 14 dias da exposição.

Tabela 7 - Latência (segundos) para observação dos sinais clínicos e para o óbito após a exposição aguda ao aldicarb (Temik®) pela via oral em camundongos (N = 3 para cada dose). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões

Grupos (Dose – mg/kg)	Latência (s)	
	Início dos sinais clínicos	Óbito
1,0	100,00 ± 17,32 (N = 3)	240,00 ± 20,60 (N = 3)
0,7	95,00 ± 13,45 (N = 3)	183,00 ± 5,77 (N = 3)
0,5	82,00 ± 6,43 (N = 3)	160,00 ± 34,64 (N = 3)
0,3	119,00 ± 19,01 (N = 3)	283,40 ± 47,06 (N = 3)
0,1	90,70 ± 16,62 (N = 3)	249,40 ± 46,70 (N = 3)
0,09	89,70 ± 14,50 (N = 3)	271,70 ± 36,85 (N = 3)
0,08	230,00 ± 45,82* (N = 3)	420,00 (N = 1)*
0,07	181,70 ± 17,56* (N = 3)	-

*p<0,05, análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Krumer para comparações múltiplas, em relação às doses de 1,0 a 0,09 mg/kg

Figura 10 - Latência (segundos) para observação dos sinais clínicos após a exposição aguda ao aldicarb pela via oral em camundongos. *p<0,05, análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Krumer para comparações múltiplas, em relação às doses de 1,0 a 0,09 mg/kg

Figura 11 - Latência (segundos) para o óbito após a exposição aguda ao aldicarb pela via oral em camundongos. * $p < 0,05$, análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey-Krumer para comparações múltiplas, em relação às doses de 1,0 a 0,09 mg/kg

Em relação aos achados histopatológicos observados nos animais que vieram a óbito logo após a exposição, poucas lesões foram observadas em todos os grupos, não sendo encontrada nenhuma relação entre a dose administrada e a intensidade dos achados. As alterações microscópicas foram encontradas nos pulmões (edema e congestão discretos a moderados), no fígado (degeneração vacuolar discreta e congestão discreta) e rins (congestão discreta), como ilustra a figura 12.

Figura 12 – Fotomicrografias de animal do grupo exposto a dose única oral de 0,3 mg/kg de aldicarb (Temik®). A) Edema (e) e congestão (c) pulmonar discreta; B) Congestão e degeneração vacuolar discreta em zona 3 (centrolobular - vcl); C) Congestão renal discreta (setas). HE, 100x, 200x e 40x, respectivamente

5.2.3 Experimento 3: Avaliação do consumo de água e ração e do ganho de peso de camundongos expostos a dose única oral de aldicarb (Temik®)

Foram utilizados 20 camundongos Swiss, divididos ao acaso em 2 grupos iguais de 10 animais cada: 1 grupo controle e 1 grupo experimental. Os animais do grupo experimental receberam por via oral (*gavage*) 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), em dose única, sendo avaliados durante 14 dias quanto ao consumo de água, ração e ganho de peso. Os animais do grupo controle receberam, pela mesma via, idêntico volume de água destilada. A comparação entre os grupos foi feita nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 14, através do Teste T-Student, e nos dias 1, 2, 7 e 14 para o ganho de peso.

A tabela 8 mostra os resultados obtidos para o consumo de água, sendo apresentados como média de consumo por dia e o respectivo desvio padrão. Nota-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos experimentais em todos os dias de avaliação, com exceção dos dias 1 e 7.

Na figura 13 pode-se observar que o consumo de água dos animais expostos ao aldicarb foi superior até o dia 5 após a exposição (com exceção do dia 1) e inferior ao consumo dos animais do grupo controle a partir do dia 10 até o final da experimentação.

Tabela 8 - Consumo de água (ml) dos animais do grupo controle e dos animais expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) pela via oral. São apresentadas as médias de consumo diário e os respectivos desvios padrões (N = número de animais)

Dia após exposição	Controle (N =10)	Experimental (N =10)
1	9,50 ± 0,08	7,00 ± 0,11*
2	6,30 ± 0,10	7,70 ± 0,12*
3	7,60 ± 0,30	8,70 ± 0,22*
5	11,00 ± 0,20	13,00 ± 0,23*
7	6,80 ± 0,10	7,00 ± 0,10
10	6,60 ± 0,30	5,40 ± 0,20*
14	7,50 ± 0,15	6,70 ± 0,17*

*p<0,05, Teste T-Student

Figura 13 - Consumo de água (ml) dos camundongos do grupo controle e do grupo exposto a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) pela via oral. Os pontos representam as médias (N = 10 por grupo), durante 14 dias de observação. *p<0,05, Teste T-Student

A tabela 9 mostra e a figura 14 ilustra os resultados do consumo de ração dos animais do grupo controle e do grupo experimental. Nota-se que os animais intoxicados consumiram menor quantidade de alimento do que os animais não expostos, sendo a diferença considerada estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todos os dias avaliados, com exceção dos dias 7 e 14, quando o consumo foi igual entre os grupos.

Tabela 9 - Consumo de ração (g) entre os animais do grupo controle e os animais expostos a uma dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) pela via oral. São apresentadas as médias de consumo diário e os respectivos desvios padrões (N = número de animais)

Dia após exposição	Controle (N=10)	Experimental (N=10)
1	5,20 ± 0,20	4,90 ± 0,10*
2	5,10 ± 0,20	4,80 ± 0,20*
3	6,00 ± 0,10	5,50 ± 0,20*
5	5,50 ± 0,10	5,00 ± 0,20*
7	8,40 ± 0,30	8,30 ± 0,20
10	6,30 ± 0,20	5,20 ± 0,10*
14	5,80 ± 0,10	5,70 ± 0,20

* $p < 0,05$, Teste T-Student

Figura 14 - Consumo de ração dos camundongos do grupo controle e do grupo exposto a uma dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]) pela via oral. Os pontos representam as médias (N = 10 por grupo), durante 14 dias de observação. *p<0,05, Teste T-Student

Quando se considera o ganho de peso nas primeiras 24 e 48 horas após a exposição (dias 1 e 2), observa-se que os animais que receberam o aldicarb por via oral tiveram, de forma significativa ($p<0,05$), os menores ganhos de peso quando comparados com os animais do grupo controle. Entretanto, após 7 e 14 dias de avaliação, não foram observadas diferenças entre o grupo controle e o grupo experimental. Estes resultados são mostrados na tabela 10 e ilustrados na figura 15.

Tabela 10 - Ganho de peso (g) dos animais do grupo controle e dos animais expostos a uma dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) pela via oral. São apresentadas as médias do ganho de peso após 1, 2, 7 e 14 dias da exposição, com seus respectivos desvios padrões (N = número de animais)

Dia após exposição	Controle (N=10)	Experimental (N=10)
1	1,10 ± 0,40	0,50 ± 0,40*
2	1,50 ± 0,60	0,90 ± 0,30*
7	2,30 ± 1,20	2,27 ± 1,00
14	3,10 ± 1,40	3,00 ± 1,00

*p<0,05, Teste T-Student

Figura 15 – Ganho de peso dos camundongos do grupo controle (C) e do grupo exposto (E) a uma dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) pela via oral. Avaliação feitas nos dias 1, 2, 7 e 14 após a exposição. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões. *p<0,05, Teste T-Student

5.2.4 Experimento 4: Avaliação das alterações microscópicas após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: estudo por microscopia óptica

Foram utilizados 50 camundongos Swiss, machos, divididos ao acaso em 5 grupos iguais, um controle (grupo controle - C) e quatro experimentais (grupos 24H, 48H, 7D e 14D). Os animais dos grupos 24H, 48H, 7D e 14D receberam a dose de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), preparada em água destilada imediatamente antes de ser administrada via *gavage*, em dose única. Os animais do grupo C receberam apenas água destilada, pela mesma via. Após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias da exposição ao praguicida, os grupos 24H, 48H, 7D e 14D, respectivamente, foram submetidos à eutanásia sob anestesia profunda com a associação de cetamina e xilazina, por via intraperitoneal. Cinco animais do grupo controle foram submetidos à eutanásia juntamente com o grupo 48H e outros cinco com o grupo 14D. Imediatamente após a morte, fragmentos dos órgãos de interesse foram coletados para a avaliação das lesões, fixados por imersão em formol 10% por, no mínimo, 48 horas, e, em seguida, foram processados, sendo as lâminas coradas com hematoxilina-eosina.

Todos os animais do grupo controle e dos grupos experimentais não apresentaram alterações ao exame histológico de encéfalo, coração, pâncreas, baço e intestino, bem como do fígado, pulmões e rins dos animais do grupo controle (Figura 16). Nos grupos expostos ao aldicarb, alterações microscópicas foram encontradas nos pulmões, no fígado e nos rins, principalmente nos animais dos grupos 24H e 48H, como mostram as figuras 17 a 20. Todos os achados histopatológicos eram de natureza circulatória e/ou degenerativa, como pode ser observado na tabela 11. Em todos os animais avaliados, seja do grupo controle ou dos experimentais, foi encontrado certo grau de degeneração hepática e renal, em intensidades diferentes, conforme mostra a tabela 12. Nos grupos tratados, nota-se que as alterações pulmonares (edema, congestão e hemorragia) foram observadas apenas nos animais dos grupos 24H e 48H (Tabelas 11 e 12). No fígado e rins, a maioria dos animais destes grupos apresentou também alterações congestivas e/ou degenerativas, enquanto nos demais grupos (7D e 14D), estas alterações foram menos freqüentes, destacando-se, em menor intensidade, as alterações degenerativas (Tabela 12).

Foi observada congestão hepática apenas nos animais submetidos a eutanásia até 48 horas, enquanto que a degeneração vacuolar foi encontrada em todos os

camundongos avaliados, sendo mais evidente a degeneração dos hepatócitos localizados próximos a veia centrolobular (zona 3) – figura 18. Nos rins, as alterações observadas foram a congestão e a hemorragia (principalmente nos animais dos grupos 24H e 48H), além de degeneração/nefroze, caracterizadas pela existência de tumefação das células do epitélio tubular, descamação celular e presença de cilindros hialinos (Figura 20).

Tabela 11 - Distribuição (número de animais acometidos) das alterações histopatológicas encontradas nos camundongos expostos a 0,08 mg/kg de aldicarb, por via oral, e submetidos à eutanásia 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) ou 14 dias (14D) após essa exposição (N = 10 por grupo)

Órgão/alteração	24H	48H	7D	14D
Pulmões				
Congestão	6	4	0	0
Edema	4	2	0	0
Hemorragia	4	1	0	0
Fígado				
Congestão	6	4	1	0
Degeneração vacuolar	10	10	10	10
Rins				
Congestão	7	4	1	0
Hemorragia	3	1	0	0
Degeneração tubular/nefroze	10	10	9	10

Tabela 12 – Distribuição absoluta das alterações *post mortem* microscópicas encontradas em camundongos controle e naqueles intoxicados experimentalmente com 0,08 mg/kg de aldicarb, por via oral, os quais foram e submetidos à eutanásia 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) ou 14 dias (14D) após essa exposição. São apresentadas as intensidades das alterações encontradas (+ = discreta; ++ moderada; +++ = severa). N = 10 por grupo

Órgão afetado				Grupos											
Controle				24H			48H			7D			14D		
	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Pulmões															
Congestão	0	0	0	6	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fígado															
Congestão	0	0	0	6	0	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0
Degeneração vacuolar	8	2	0	1	4	5	2	4	4	6	3	0	7	2	1
Rins															
Congestão	0	0	0	6	1	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Degeneração/nefroze	8	0	0	5	0	5	4	4	2	9	0	0	9	1	0

Figura 16 – Fotomicrografias de fígado, rim e pulmão de camundongos do grupo controle. A) Fígado, espaço porta (zona 1), HE, 200x; B) Fígado, zona 2, HE, 200x; C) Fígado, veia centro lobular (zona 3), HE, 400x; D) Rim, HE, 200x; E) Rim, HE, 200x; F) Pulmão, HE, 200x. Todos apresentaram histologia dentro do padrão de normalidade

Figura 17 – Fotomicrografias de pulmão de animais expostos a 0,08 mg/kg de aldicarb e submetido a eutanásia 24 horas (A e B) ou 48 horas (C) após a exposição. A) Congestão e hemorragia, HE, 100x; B) Congestão e edema (seta) discretos, HE, 100x; C) Edema e congestão, HE, 100x

Figura 18 – Fotomicrografias de fígado de camundongos expostos a 0,08 mg/kg de aldicarb e submetidos a eutanásia após 24 horas (A, B e C) ou 48 horas (D, E e F), demonstrando degeneração vacuolar de hepatócitos. A) Zona 1 preservada (espaço porta), HE, 200x; B) Vacuolização em zona 2, congestão discreta, HE, 100x; C) Degeneração em zona 3, HE, 100x; D) Vacuolização generalizada, HE, 100x; E) Vacuolização discreta em zona 3, HE, 100x; F) Vacuolização intensa em zona 3, HE, 200x

Figura 19 – Fotomicrografias de fígado de animal exposto a 0,08 mg/kg de aldicarb e submetido a eutanásia 24 horas após a exposição. Notar a degeneração vacuolar hepática zonária (áreas mais claras), em contraste com áreas de parênquima normal (áreas mais escuras). A, HE, 40x; B, HE, 5x

Figura 20 – Fotomicrografias de rim de camundongos expostos a 0,08 mg/kg de aldicarb e submetidos a eutanásia após 24 horas (A, B, E, G) ou 48 horas (C, D, F, H, I). A e B) Congestão e hemorragia, HE, 40x e 100x, respectivamente; C) Hemorragia focal, congestão, degeneração do epitélio tubular, HE, 100x; D) Congestão, degeneração do epitélio tubular, HE, 40x; E) Degeneração tubular, com vacuolização das células epiteliais e conteúdo hialino intratubular, HE, 100x; F) Degeneração tubular, com vacuolização das células epiteliais e conteúdo hialino intratubular, HE, 100x; G) Cilindros hialinos, hemorragia focal, HE, 100x; H, I) Dilatação evidente do corpúsculo renal (setas) e degeneração das células epiteliais tubulares, HE, 200x

Para a avaliação semiquantitativa das alterações histopatológicas, foi selecionada a degeneração vacuolar de hepatócitos e a degeneração tubular renal, visto serem estas as alterações mais frequentes em todos os grupos estudados. Nota-se que os grupos 24H e 48H apresentaram os maiores escores para a degeneração hepática e tubular renal, sendo a diferença considerada significativa em relação ao grupo controle e aos grupos 7D e 14D (degeneração hepática - $F(4, 45)=7,707$; $p<0,05$; degeneração tubular - $F(4,45)=7,034$; $p<0,05$), como mostra a Tabela 13 e ilustra a Figura 21.

Tabela 13 - Análise microscópica semiquantitativa da degeneração hepática e renal encontrada nos animais do grupo controle e dos intoxicados experimentalmente com 0,08 mg/kg de aldicarb, os quais foram submetidos à eutanásia 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) ou 14 dias (14D) após a exposição. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões dos escores de intensidades das alterações encontradas (escores: 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = severo). N = 10 por grupo

Alteração	Controle	24H	48H	7D	14D
Fígado					
Degeneração vacuolar	1,20 ± 0,42	2,40 ± 0,70 ^a	2,20 ± 0,80 ^a	1,30 ± 0,48 ^{b c}	1,40 ± 0,70 ^b
Rins					
Degeneração tubular	0,80 ± 0,42	2,00 ± 1,05 ^d	1,80 ± 0,80 ^e	0,90 ± 0,30 ^{f h}	1,10 ± 0,31 ^g

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: ^a $p<0,01$ em relação ao grupo controle; ^b $p<0,01$ em relação ao grupo 24H; ^c $p<0,01$ em relação ao grupo 48H; ^d $p<0,01$ em relação ao grupo controle; ^e $p<0,05$ em relação ao grupo controle; ^f $p<0,01$ em relação ao grupo 24H; ^g $p<0,05$ em relação ao grupo 24H; ^h $p<0,05$ em relação ao grupo 48H

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: ^a $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; ^b $p < 0,01$ em relação ao grupo 24H; ^c $p < 0,01$ em relação ao grupo 48H; ^d $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; ^e $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; ^f $p < 0,01$ em relação ao grupo 24H; ^g $p < 0,05$ em relação ao grupo 24H; ^h $p < 0,05$ em relação ao grupo 48H

Figura 21 – Análise microscópica semiquantitativa da intensidade da degeneração hepática e tubular renal em camundongos intoxicados experimentalmente com 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), os quais foram submetidos à eutanásia 24 horas (24H), 48 horas (24H), 7 dias (7D) ou 14 dias (14D) após essa exposição. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões dos escores de intensidades das alterações encontradas (escores: 1 = discreto; 2 moderado; 3 = severo). N = 10 por grupo

5.2.5 *Experimento 5: Avaliação das alterações ultraestruturais após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: estudo por microscopia eletrônica de transmissão*

Foram utilizados 9 camundongos Swiss, machos, divididos ao acaso em 3 grupos iguais, sendo um controle (C) e dois experimentais (grupos 24H e 48H). Os animais dos grupos 24H e 48H receberam a dose de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), preparada em água destilada imediatamente antes de ser administrada via *gavage*, em dose única. Os animais do grupo C receberam apenas água destilada, pela mesma via. Após 24 horas e 48 horas da exposição ao praguicida, os grupos 24H e 48H, respectivamente, foram profundamente anestesiados com uma associação de cetamina e xilazina e receberam, por via intraperitoneal, dose única de heparina de 0,1 ml, a fim de evitar a formação de coágulos intravasculares durante o procedimento. Em seguida, foram submetidos ao procedimento de perfusão com o fixador glutaraldeído 2,5%, conforme descrito no item 4.2.4.4.2. Fragmentos do fígado e rins foram então removidos e mantidos no mesmo fixador, em refrigeração, por no mínimo 24 horas, até o processamento (4.2.4.4.2). Os animais do grupo C foram submetidos a eutanásia e aos demais procedimentos juntamente com os animais do grupo 48H.

Para a seleção das áreas de interesse, os cortes dos tecidos foram inicialmente corados com azul de toluidina para escolha dessas áreas, e observados por meio da microscopia de luz (Figura 22). Após esta seleção, os blocos foram novamente trimados, os cortes coletados em telas e contrastados com metais pesados, sendo as telas analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão do Departamento de Microscopia Eletrônica do ICB/USP.

Ressalta-se os grupos de 24H e 48H foram os escolhidos para este estudo em virtude de terem sido aqueles que apresentaram o maior grau/intensidade de alterações hepáticas e renais em estudos prévios de microscopia óptica (experimento 4).

Figura 22 – Fotomicrografia de fígado (A) e rim (B) de um animal do grupo experimental. Azul de toluidina, 400x

A análise do fígado à microscopia eletrônica mostrou, nos animais de ambos os grupos tratados, hepatócitos nítidos e poliédricos; no grupo 24H, foi observada a presença de tumefação citoplasmática (áreas eletrotranslúcidas), tumefação mitocondrial discreta e, no grupo 48H, a presença de vacúolos citoplasmáticos com conteúdo semi-translúcido. A figura 23 mostra estas alterações.

Na análise ultraestrutural do rim, foi encontrada tumefação citoplasmática das células do epitélio dos túbulos renais, bem como de suas mitocôndrias, as quais mostraram certo grau de desorganização, de forma mais acentuada naqueles animais do grupo 48 horas. Nota-se o desarranjo do epitélio tubular, o despregamento celular e a presença de conteúdo intratubular. Nenhuma alteração foi observada nos animais do grupo controle.

Figura 23 – Eletromicrografias de animais do grupo controle (A e B) e dos grupos expostos a 0,08 mg/kg de aldicarb e submetidos a eutanásia 24 horas (grupo 24H – C e D) ou 48 horas (grupo 48H – E e F). Em A, observam-se hepatócitos normais (2000x); em C, hepatócitos apresentando diversas áreas de tumefação citoplasmática (seta) (2500x) e, em E, a presença de vacúolos citoplasmáticos (*) de diversos tamanhos (2000x). Em B, observam-se células tubulares renais normais (1500x); em D e F (2000x), há túbulos renais com células desarranjadas, com citoplasma e mitocôndrias tumefeitas (setas) e, em D, a presença de conteúdo intraluminal (d) (1500x). n = núcleo, c = citoplasma, s = sinusóide. (C e D)

5.2.6 *Experimento 6: Avaliação das alterações microscópicas após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: avaliação histoquímica hepática para glicogênio e gordura*

Foram utilizados 50 camundongos Swiss machos, os quais foram distribuídos ao acaso em 5 grupos iguais, um controle (grupo controle - C) e quatro experimentais (grupos 24H, 48H, 7D e 14D). Os animais dos grupos 24H, 48H, 7D e 14D receberam a dose de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), preparada em água destilada imediatamente antes de ser administrada via *gavage*, em dose única. Os animais do grupo C receberam apenas água destilada, pela mesma via. Após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias da exposição ao praguicida, os grupos 24H, 48H, 7D e 14D, respectivamente, foram submetidos à eutanásia sob anestesia profunda com a associação de cetamina e xilazina, por via intraperitoneal. Cinco animais do grupo controle foram submetidos à eutanásia juntamente com o grupo 48H e outros cinco com o grupo 14D. Imediatamente após a eutanásia, fragmentos do fígado foram coletados e fixados por imersão em formol 10% por, no mínimo, 48 horas antes do processamento histoquímico para glicogênio (PAS). Para a avaliação histoquímica de presença de gordura (coloração *sudan black*), os fragmentos hepáticos foram congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a retirada, sendo mantidos em freezer a – 80 °C até o processamento.

A avaliação histoquímica para glicogênio resultou negativa para todos os grupos avaliados, como mostra a figura 24. Na avaliação histoquímica pelo *sudan black*, foi observada vacuolização citoplasmática evidente nos hepatócitos dos animais do grupo 24H, embora apenas nos animais do grupo 48H a reação foi positiva para gorduras (vacúolos enegrecidos), como mostra a figura 25. Nenhuma diferença foi encontrada entre os animais do grupo C e aqueles dos grupos 7D e 14D.

Figura 24 – Fotomicrografia de fígado, no qual foi feita histoquímica para glicogênio. Animal do grupo controle (A, 100x) e dos grupos expostos a 0,08 mg/kg de aldicarb, sendo submetido à eutanásia após 24 horas (B, 100x) ou 48 horas (C, 100x). É possível notar que os vacúolos citoplasmáticos dos hepatócitos não foram corados pelo PAS

Figura 25 – Fotomicrografia de fígado, no qual foi feita histoquímica para gordura - *Sudan black*. A) Animal do grupo controle (200x); B) Animal do grupo expostos a 0,08 mg/kg de aldicarb e submetido a eutanásia após 24 horas (200x); C) Animal do grupo expostos a 0,08 mg/kg de aldicarb e submetido a eutanásia após 48 horas (400x). Notar a vacuolização citoplasmática evidente em B, embora sendo positiva (pontos enegrecidos) apenas em C

5.2.7 Experimento 7: Estudo das alterações hematológicas após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: avaliação após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias

Foram utilizados 50 camundongos Swiss, distribuídos ao acaso em 5 grupos iguais de 10 animais cada: 1 grupo controle e 4 grupos experimentais. Os animais do grupo experimental receberam por via oral (*gavage*) 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) e os animais do grupo controle receberam, pela mesma via, idêntico volume de água destilada. Após 24 horas (grupo 24H), 48 horas (grupo 48H), 7 (grupo 7D) e 14 dias (grupo 14D) os animais foram submetidos à anestesia profunda com cetamina e xilazina, por via intra peritoneal, para a colheita de sangue do plexo infraorbitário, com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, contendo anticoagulante (EDTA). Cinco animais do grupo controle foram submetidos a estes procedimentos juntamente com o grupo 48H e outros cinco com o grupo 14D. Foram avaliadas a série vermelha (número de hemácias, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos - VCM, HCM e CHCM) e a série branca (número de leucócitos e contagem diferencial). Os resultados são apresentados nas tabelas 14 e 15, e aqueles que apresentaram diferença estatisticamente significativa são ilustrados pelas figuras 26 a 34.

Resultados da avaliação da série vermelha

A tabela 14 mostra os resultados obtidos na avaliação da série vermelha. Nota-se que, após 24 horas da exposição (24H), os animais apresentaram as menores contagens do número de hemácias, sendo a diferença considerada estatisticamente significativa entre eles e os animais dos grupos controle, 7D e 14D [$F(4,45)=8,301$; $p<0,05$] – figura 26. Já em relação ao hematócrito, os animais do grupo 48H apresentaram valores que diferiram estatisticamente dos grupos 24H e 14D [$F(4,45)=3,917$; $p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente] – figura 27. Quando se consideram os parâmetros hematimétricos, o grupo 24H diferiu estatisticamente [$F(4,45)=15,933$; $p<0,001$] – figura 28 dos demais grupos quanto ao VCM e dos grupos controle, 7D e 14D [$F(4,45)=11,121$; $p<0,01$ e $p<0,001$] – figura 29, quanto ao HCM. Não foram observadas diferenças significantes nos valores de hemoglobina e CHCM nos diversos grupos avaliados.

Tabela 14 – Parâmetros do hemograma – série vermelha do grupo controle e dos animais expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo) dos valores encontrados após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias(14D) após a exposição

Série vermelha					
Parâmetros	Grupos				
	Controle	24H	48H	7D	14D
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$8,41 \pm 1,00^a$	$6,55 \pm 1,00$	$7,80 \pm 1,50$	$9,00 \pm 1,51^a$	$9,32 \pm 0,90^a$
Hemoglobina (g/dl)	$12,90 \pm 2,45$	$11,53 \pm 1,80$	$12,30 \pm 2,05$	$12,34 \pm 2,80$	$13,20 \pm 1,32$
Hematócrito (%)	$41,10 \pm 4,43$	$43,00 \pm 2,80^b$	$37,50 \pm 5,12$	$40,40 \pm 3,00$	$43,40 \pm 2,71^{b*}$
VCM (fl)	$49,00 \pm 3,37^c$	$66,89 \pm 11,20$	$48,75 \pm 5,76^c$	$45,95 \pm 7,55^c$	$46,76 \pm 3,31^c$
HCM (pg)	$14,89 \pm 1,43^d$	$17,60 \pm 0,94$	$15,92 \pm 1,11$	$13,70 \pm 2,57^{d*}$	$14,00 \pm 0,60^{d*}$
CHCM (%)	$31,00 \pm 0,3$	$27,00 \pm 0,4$	$33,00 \pm 0,3$	$30,00 \pm 0,7$	$30,00 \pm 0,2$
Anova seguida do teste Tukey-Kramer: ^a $p < 0,05$, em relação ao grupo 24 horas; ^b $p < 0,05$ e ^{b*} $p < 0,01$ em relação ao grupo 48 horas; ^c $p < 0,001$, em relação ao grupo 24 horas; ^d $p < 0,01$ e ^{d*} $p < 0,001$ em relação ao grupo 24 horas

Figura 26 – Número de hemácias do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$, em relação ao grupo 24 horas

Figura 27 – Hematócrito do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$ e # $p < 0,01$ em relação ao grupo 48 horas

Figura 28 – VCM do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,001$, em relação ao grupo 24 horas

Figura 29 – HCM do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,01$ e # $p < 0,001$ em relação ao grupo 24 horas

Resultados da avaliação da série branca

A tabela 15 mostra os resultados obtidos na avaliação dos glóbulos brancos. Observam-se diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle: redução do número de leucócitos totais nos animais dos grupos 24H, 48H e 7D [$F(4,45)=5,131$; $p<0,05$] – figura 30; diminuição do número de neutrófilos nos animais dos grupos nos grupos 24H, 48H e 7D [$F(4,45)=12,532$; $p<0,05$] – figura 31; redução do número de basófilos [$F(4,45)=12,298$; $p<0,01$] – figura 32 e de monócitos em todos os grupos experimentais [$F(4,45)=33,275$; $p<0,01$] – figura 33, bem como do número de linfócitos 24 horas (24H), 48 horas (48H) e 7 dias (7D) após a exposição [$F(4,45)=7,572$; $p<0,01$] – figura 34. Não foram observadas diferenças significantes no número de eosinófilos nos diversos grupos avaliados.

Tabela 15 – Parâmetros do hemograma – série branca do grupo controle e dos animais expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]) pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo) dos valores encontrados após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias(14D) após a exposição

Série Branca					
Parâmetros	Grupos				
(x 10 ³ /mm ³)	Controle	24H	48H	7D	14D
Leucócitos	5,5±0,8	3,42±1,1 ^a	3,41±1,00 ^a	3,40±1,50 ^a	4,63±1,93
Neutrófilos	0,49±0,08	0,18±0,11 ^b	0,19±0,06 ^b	0,18±0,16 ^b	0,33±0,18
Basófilos	0,07±0,02	0,03±0,01 ^c	0,03±0,010 ^c	0,03±0,09 ^c	0,04±0,02 ^c
Eosinófilos	0,05±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01
Monócitos	0,31±0,07	0,13±0,04 ^d	0,09±0,04 ^d	0,14±0,04 ^d	0,19±0,04 ^d
Linfócitos	4,83±0,90	2,83±0,90 ^e	3,01±1,04 ^e	2,43±0,72 ^e	3,87±1,82

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: ^a $p<0,05$ em relação ao grupo controle; ^b $p<0,05$ em relação ao grupo controle; ^c $p<0,01$ em relação ao grupo controle; ^d $p<0,01$ em relação ao grupo controle; ^e $p<0,01$, em relação ao grupo controle

Figura 30 – Número de leucócitos do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,05 em relação ao grupo controle

Figura 31 – Número de neutrófilos do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,05 em relação ao grupo controle

Figura 32 – Número de basófilos do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: *p<0,01 em relação ao grupo controle

Figura 33 – Número de monócitos do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: *p<0,01 em relação ao grupo controle

Figura 34 – Número de linfócitos do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle

5.2.8 Experimento 8: Avaliação das alterações bioquímicas após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: avaliação após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias

Foram utilizados 50 camundongos Swiss, distribuídos ao acaso em 5 grupos iguais de 10 animais cada: 1 grupo controle e 4 grupos experimentais. Os animais do grupo experimental receberam por via oral (*gavage*) 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) e os animais do grupo controle receberam, pela mesma via, volume idêntico de água destilada. Após 24 horas (grupo 24H), 48 horas (grupo 48H), 7 (grupo 7D) e 14 dias (grupo 14D) os animais foram submetidos à anestesia profunda com cetamina e xilazina, por via intraperitoneal, para a colheita de sangue pela via intracardíaca, com auxílio de seringa de 1 ml e agulha 24G, sem anticoagulante. Cinco animais do grupo controle foram submetidos a estes procedimentos juntamente com o grupo 48H e outros cinco com o grupo 14D. Foram avaliadas a função hepática (AST, ALT, GGT, FA, PT, ALB, GLO, UR – resultados apresentados na função renal, TRI e COL), a função renal (UR e CR), a função do pâncreas exócrino (amilase e lipase) e a lesão muscular esquelética cardíaca (CK-Mb). Os resultados são apresentados nas tabelas 16, 17, 18 e 19, respectivamente, e ilustrados pelas figuras 35 a 41.

Função hepática

A tabela 16 mostra os resultados obtidos na avaliação da função hepática. Pode-se observar que as diferenças significantes foram encontradas:

- ALT: níveis séricos reduzidos no grupo 48H em relação ao grupo 14D [$F(4,45)=3,408$; $p<0,05$] – figura 35;
- PT: níveis séricos aumentados no grupo 7D em relação ao grupo controle e 14D [$F(4,45)=3,269$; $p<0,05$] – figura 36;
- ALB: níveis séricos aumentados no grupo 7D em relação ao grupo controle [$F(4,45)=2,743$; $p<0,05$] – figura 37;
- GLO: níveis séricos aumentados no grupo 7D em relação ao grupo controle [$F(4,45)=3,411$; $p<0,05$] – figura 38;

- GLI: níveis séricos aumentados no grupo 24H em relação ao grupo controle, redução significativo no grupo 7D em relação aos demais grupos expostos [$F(4,45)=10,490$; $p<0,05$ e $p < 0,001$] – figura 39;
- TRI: níveis superiores nos grupos 24H e 48H em relação ao grupo controle e superiores estatisticamente no grupo 48H em relação ao grupos 7D e 14D [$F(4,45)=34,642$; $p<0,001$ e $p<0,001$] – figura 40;
- COL: os grupos 48H e 7D apresentaram os menores níveis séricos em relação aos grupos controle, 24H e 14D [$F(4,45)=26,665$; $p<0,001$] – figura 41.

Tabela 16 – Parâmetros da função hepática dos animais expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo) dos valores encontrados após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D) após a exposição

Parâmetros	Grupos				
	Controle	24H	48H	7D	14D
AST (U/L)	82,17±24,06	88,50±47,00	63,50±30,65	69,15±29,75	84,30±12,22
ALT (U/L)	15,15±2,10	16,90±3,80	14,00±4,80 ^a	14,85±3,70	19,93±5,1
GGT (U/L)	5,15±2,13	5,00±2,20	4,20±1,55	6,10±2,20	4,55±2,25
FA	126,84±26,35	108,37±17,10	95,00±41,32	86,60±45,00	71,80±21,34
PT (g/dL)	5,35±0,70 ^b	5,85±1,70	6,20±1,64	7,76±2,64	5,52±1,10 ^b
ALB (g/dL)	2,34±0,14	2,60±0,47	2,76±0,60	3,00±0,80 ^c	2,40±0,30
GLO (g/dL)	3,00±0,61	3,30±1,24	3,43±1,03	4,75±1,91 ^d	3,12±0,83
GLI (mg/dL)	119,40±16,20	143,20±13,75 ^{d e}	137,63±22,80 ^e	99,70±7,00	141,80±25,20 ^e
TRI (mg/dL)	101,20±18,73	151,55±16,17 ^f	143,56±23,15 ^f	75,27±18,00 ^g	90,00±19,24 ^g
COL (mg/dL)	61,56±9,50	67,30±8,60	42,25±6,60 ^{h i j}	33,60±8,13 ^{h i j}	68,36±13,80

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: ^a p<0,05 em relação ao grupo 14 dias; ^b p<0,05 em relação ao grupo 7 dias; ^c p<0,05 em relação ao grupo controle; ^d p<0,05 em relação ao grupo controle e ^e p<0,001 em relação ao grupo 7 dias; ^f p<0,001 em relação ao grupo controle e ^g p<0,001, em relação ao grupo 48 horas; ^h p<0,001 em relação ao grupo controle, ⁱ p<0,001 em relação ao grupo 24 horas e ^j p<0,001 em relação ao grupo de 14 dias

Figura 35 –Níveis séricos da enzima ALT do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$ em relação ao grupo 14 dias

Figura 36 – Proteínas séricas totais do grupo controle e dos grupos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$ em relação ao grupo 7 dias

Figura 37 – Níveis séricos de albumina dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Figura 38 – Níveis séricos de globulinas dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Figura 39 – Níveis séricos de glicose dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,001$ em relação ao grupo 7 dias

Figura 40 – Níveis séricos de triglicerídeos dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,001$ em relação ao grupo 48 horas

Figura 41 – Níveis séricos de colesterol dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,001$ em relação ao grupo 24 horas e ° $p < 0,001$ em relação ao grupo 14 dias

Função renal

A tabela 17 mostra os resultados obtidos na avaliação da função renal de animais do grupo controle e daqueles expostos ao aldicarb, sendo avaliados 24 horas (grupo 24H), 48 horas (grupo 48H), 7 dias (grupo 7D) ou 14 dias (grupo 14D) após a intoxicação.

Tabela 17 – Parâmetros da função renal dos animais expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo) dos valores encontrados após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D) após a exposição

Parâmetros	Grupos				
	Controle	24H	48H	7D	14D
UR (mg/dL)	58,00±8,32	52,40±9,60	55,80±8,70	52,70±9,00	43,80±4,00*
CR (mg/dL)	0,67±0,06	0,90±0,07**	0,90±0,12**	0,74±0,04 [#]	0,73±0,04 [#]

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,01 e ** p<0,001 em relação ao grupo controle; [#]p<0,01 em relação ao grupo 24H e 48H

Nota-se que os animais expostos ao aldicarb, dos grupos 24H e 48H, apresentaram os maiores níveis séricos de creatinina quando comparados ao grupo controle, sendo esta diferença considerada significativa [F(4,45)=26,719; p<0,001] em relação ao grupo controle. Os valores de creatinina dos grupos 7D e 14D também diferiram de forma significativa com estes dois grupos [F(4,45)=26,719; p<0,01]. Os animais submetidos a eutanásia aos 14 dias após a exposição (grupo 14D) apresentaram níveis séricos de uréia inferiores ao do grupo controle [F(4,45)=4,360; p<0,05]. Estes resultados são ilustrados pelas figuras 42 e 43.

Figura 42 – Níveis séricos de uréia dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: *p<0,01 em relação ao grupo controle

Figura 43 – Níveis séricos de creatinina dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: **p<0,001 em relação ao grupo controle; *p<0,01 em relação ao grupo 24H e 48H

Função pancreática exócrina

A tabela 18 mostra os resultados obtidos na avaliação da função pancreática exócrina, por meio dos níveis séricos das enzimas amilase e lipase. Nota-se que houve aumento significativo [$F(4,45)=9,494$; $p<0,05$] nos níveis da amilase nos animais submetidos à eutanásia 24 horas (24H) após a exposição ao aldicarb, quando comparados ao grupo controle (Figura 44). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o grupo controle e os experimentais em relação aos níveis séricos de lipase [$F(4,45)=6,249$; $p>0,05$].

Tabela 18 – Parâmetros da função do pâncreas exócrino dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo) dos valores encontrados após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D) após a exposição

Parâmetros	Grupos				
	Controle	24H	48H	7D	14D
Amilase (U/L)	732,35±8,70	755,35±12,80*	739,63±3,43	742,70±4,75	741,35±9,60
Lipase (UI)	215,30±39,20	207,15±16,17	186,05±22,32	235,03±25,34	181,20±30,00

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p<0,05$ em relação ao grupo controle

Figura 44 – Níveis séricos da amilase dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Lesão muscular esquelética cardíaca

A tabela 19 mostra os resultados obtidos na avaliação dos níveis séricos da enzima CK-Mb, específica marcadora de lesão muscular cardíaca. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os diferentes grupos avaliados [$F(4,45)=3,113$; $p > 0,05$].

Tabela 19 – Níveis da enzima CK-Mb dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 10 por grupo) dos valores encontrados após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D) após a exposição

Parâmetro	Grupos				
	Controle	24H	48H	7D	14D
CK-Mb (UI)	374,80±65,22	294,50±84,83	356,00±86,40	299,00±79,00	282,40±46,34

5.2.9 Experimento 9: Avaliação do peso relativo de timo, baço e fígado, e celularidade do baço após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: efeitos após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias

Foram utilizados 30 camundongos Swiss, distribuídos ao acaso em 5 grupos iguais de 6 animais cada: 1 grupo controle e 4 grupos experimentais. Os animais do grupo experimental receberam por via oral (*gavage*) 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) e os animais do grupo controle receberam, pela mesma via, idêntico volume de água destilada. Após 24 horas (grupo 24H), 48 horas (grupo 48H), 7 (grupo 7D) e 14 dias (grupo 14D) os animais foram submetidos à eutanásia, por meio de anestesia profunda com cetamina e xilazina, por via intraperitoneal, para a colheita do timo, do baço e do fígado, para cálculo do peso relativo, e avaliação da celularidade do baço, conforme descrito no item 4.2.4.7. Três animais do grupo controle foram submetidos à eutanásia e aos demais procedimentos juntamente com o grupo 48H e os outros três com o grupo 14D.

Os animais dos grupos 24H e 48H apresentaram pesos relativos do timo maiores do que aqueles dos animais do grupo controle, sendo esta diferença considerada estatisticamente significativa [$F(4,25)=4,892$; $p<0,05$, figura 45]. Em relação ao peso relativo do baço, não houve diferença estatística entre os grupos [$F(4,25)=0,7470$; $p>0,05$]. Os grupos 48H e 7D apresentaram os maiores pesos relativos de fígado, sendo a diferença significativa em relação ao peso relativo do fígado dos animais do grupo controle [$F(4,25)=7,934$; $p<0,01$ e $p<0,001$, figura 46]. Estes resultados são apresentados na tabela 20.

Tabela 20 – Pesos relativos (g/100 g de peso vivo – P.V.) do timo, do baço e do fígado dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo) dos valores encontrados após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D) após a exposição

Peso relativo (g/100g P.V.)	Grupos				
	Controle	24H	48H	7D	14D
Timo	0,14±0,03	0,23±0,05*	0,24±0,06*	0,20±0,03	0,16±0,05
Baço	0,60±0,07	0,60±0,03	0,61±0,08	0,60±0,07	0,65±0,11
Fígado	4,70±0,26	5,15±0,20	5,44±0,32*	5,74±0,24 [#]	5,16±0,60

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,01 e [#] p<0,001 em relação ao grupo controle

Figura 45 – Pesos relativos do timo dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,01 em relação ao grupo controle

Figura 46 – Pesos relativos do fígado dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle

Em relação à celularidade do baço, a tabela 21 mostra que houve aumento estatisticamente significativo [$F(4,25)=207,85$; $p < 0,001$] nos grupos 24H e 48H, em relação grupo controle e aos demais grupos experimentais (7D e 14D). Estes dados são apresentados na tabela 21 e ilustrados pela figura 47.

Tabela 21 – Celularidade do baço dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo) dos valores encontrados após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D) após a exposição

Celularidade (x 10 ⁷)	Grupos				
	Controle	24H	48H	7D	14D
Baço	1,07±0,08	7,20±0,90*	5,16±0,50*	1,00±0,20	1,10±0,25

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,001 em relação aos grupos controle, 7 e 14 dias

Figura 47 – Celularidade do baço (x 10⁷) dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,001 em relação aos grupos controle, 7 dias e 14 dias

5.2.10 *Experimento 10: Avaliação global das células da medula óssea após a intoxicação aguda por aldicarb (Temik®) em camundongos: efeitos após 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias*

Foram utilizados 30 camundongos Swiss, distribuídos ao acaso em 5 grupos iguais de 6 animais cada: 1 grupo controle e 4 grupos experimentais. Os animais do grupo experimental receberam por via oral (*gavage*) 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®) e os animais do grupo controle receberam, pela mesma via, idêntico volume de água destilada. Após 24 horas (grupo 24H), 48 horas (grupo 48H), 7 (grupo 7D) e 14 dias (grupo 14D) os animais foram submetidos à eutanásia, por meio de anestesia profunda com cetamina e xilazina, por via intraperitoneal, para a colheita do fêmur direito, e contagem das células contidas em sua medula, conforme descrito no item 4.2.4.8. Três animais do grupo controle foram submetidos à eutanásia e aos demais procedimentos juntamente com o grupo 48H e os outros três com o grupo 14D.

Após esta avaliação, foi constatado que os animais do grupo 7D foram os que apresentaram os maiores valores da celularidade global da medula óssea, sendo estes estatisticamente diferentes [$F(4,25)=6,260$; $p<0,01$] dos encontrados para os grupos 24H e 48H, os quais mostraram os menores valores. Estes dados são apresentados na tabela 22 e ilustrados pela figura 48.

Tabela 22 – Celularidade da medula dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo) dos valores encontrados após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D) após a exposição

Celularidade (x 10 ⁷)	Grupos				
	Controle	24H	48H	7D	14D
Medula	2,75±0,10	2,13±0,40	2,14±0,42	3,17±0,40*	2,71±0,70

Anova seguida do teste Tukey-Kramer : * p<0,01 em relação aos grupos 24 e 48 horas

Figura 48 – Celularidade da medula (x 10⁷) dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), pela via oral, após 24 horas (24H), 48 horas (48H), 7 dias (7D) e 14 dias (14D). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,01 em relação aos grupos 24 e 48 horas

5.2.11 *Experimento 11: Avaliação in vivo da apoptose - quantificação dos corpúsculos apoptóticos hepáticos e avaliação das lesões microscópicas*

Foram utilizados 30 camundongos Swiss machos distribuídos ao acaso em 3 grupos iguais, um controle e dois experimentais (grupos 24H e grupo 48H). Os animais dos grupos 24H e 48H receberam a dose de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik[®]), preparada em água destilada imediatamente antes de ser administrada via *gavage*, em dose única. Os animais do grupo controle receberam apenas água destilada, pela mesma via. Após 24 horas e 48 horas da exposição ao praguicida, os grupos 24H e 48H, respectivamente, foram submetidos à eutanásia sob anestesia profunda com a associação de cetamina e xilazina, por via intraperitoneal. O grupo controle foi submetido à eutanásia juntamente com o grupo 48H. Imediatamente após a eutanásia, fragmentos do fígado foram coletados para a avaliação das lesões (N = 10) e quantificação dos corpúsculos apoptóticos (N = 6), sendo fixados por imersão em formol 10% por, no mínimo, 48 horas antes do processamento. Após este período, os fragmentos foram cortados em pequenos blocos com aproximadamente 1 cm³, quando então foram submetidos ao procedimento usual de inclusão em parafina. A seguir, foram realizados cortes de 5 µ de espessura e as lâminas foram devidamente montadas e coradas com hematoxilina-eosina.

A avaliação das lesões hepáticas foi realizada por meio de microscopia óptica, com classificação da intensidade das alterações e substituição dos escores para a análise estatística, foi realizada conforme descrito no item 4.2.4.4.1.

A identificação e contagem dos corpúsculos apoptóticos foi feita nos cortes histológicos de fígado, sob a lâmpada de fluorescência (aumento de 400X). Antes desta mensuração, o território de interesse foi localizado, procedendo-se, em seqüência, o congelamento da imagem (Figura 49) e a sua mensuração. Em seguida, todos os corpúsculos apoptóticos foram contados, após confirmação na microscopia de luz, e o resultado dividido pela área do fragmento. Estes procedimentos foram descritos no item 4.2.4.9.

Figura 49 – Fotomicrografia de fragmento hepático selecionado para mensuração e determinação da área (HE, 5x)

Ressalta-se os grupos de 24H e 48H foram os escolhidos para este estudo em virtude de terem sido aqueles que apresentaram o maior grau/intensidade de alterações hepáticas em estudos prévios de microscopia óptica (experimento 4).

Os resultados obtidos na quantificação dos corpúsculos apoptóticos são mostrados na tabela 23. Pode-se observar que os animais intoxicados demonstraram tendência a aumento do número de corpúsculos apoptóticos hepáticos, em relação aos animais não expostos, sendo esta diferença considerada significativa em relação ao grupo controle nos animais do grupo 24H [$F(2,15)=6,580$; $p<0,01$]. Estes dados estão ilustrados pela figura 50. Os corpúsculos apoptóticos emitem fluorescência característica e sua presença pôde ser confirmada por meio da microscopia de luz (Figura 51).

A principal alteração microscópica encontrada, tanto nos animais do grupo 24H quanto nos do grupo 48H, foi a degeneração vacuolar, evidente principalmente nas zonas 2 (intermediária) e zona 3 (veia centrolobular - VCL) – figura 53. A tabela 24 e a figura 52 mostram estes resultados, onde se observa diferença significativa entre os animais dos grupos expostos ao aldicarb e o grupo controle [$F(2,27)=7,252$; $p<0,05$]. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos 24H e 48H.

Tabela 23 – Quantificação dos corpúsculos apoptóticos hepáticos dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo) dos valores encontrados no grupo controle e 24 horas (24H) e 48 horas (48H) após a exposição

Grupos	Número de corpúsculos apoptóticos hepáticos/mm ²
Controle	0,17±0,02
24H	0,30±0,09*
48H	0,25±0,08

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,01 em relação ao grupo controle

Figura 50 – Quantificação dos corpúsculos apoptóticos hepáticos (nº/mm²) dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H) e 48 horas (48H) da exposição. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,01 em relação ao grupo controle

Figura 51 – Corpúsculos apoptóticos hepáticos observados por microscopia de fluorescência (A e B) e sua respectiva imagem na microscopia de luz (A1 e B1). As fotomicrografias A e A1 correspondem a um animal expostos a 0,08 mg/kg de aldicarb após 24 horas da exposição e as fotomicrografias B e B1 àqueles expostos após 48 horas. HE, 400x

Tabela 24 – Intensidade da degeneração vacuolar hepática (escores: 0 = ausência, 1 = discreta, 2 = moderada, 3 = severa) dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H) e 48 horas (48H) da exposição. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N=10 por grupo)

Grupo	Intensidade da lesão
Controle	1,1 ± 0,31
24H	2,3 ± 0,94*
48H	1,9 ± 0,73*

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,05 em relação ao grupo controle

Figura 52 - Intensidade da degeneração vacuolar hepática (escores: 0 = ausência, 1 = discreta, 2 = moderada, 3 = severa) dos animais do grupo controle e dos expostos a dose única de 0,08 mg/kg de aldicarb (Temik®), pela via oral, após 24 horas (24H) e 48 horas (48H) da exposição. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões. Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * p<0,05 em relação ao grupo controle (N= 10 por grupo)

Figura 53 – Fotomicrografias do fígado de animal do grupo controle (A - HE, 200x) e de um do grupo 24H (B e C - HE, 200x e 100x, respectivamente). Notar em B a degeneração vacuolar evidente em zona 3 e, em C, apenas a zona 1 apresenta-se preservada

5.2.12 *Experimento 12: Avaliação in vitro da morte de leucócitos por necrose/apoptose – estudo por citometria de fluxo*

A escolha das concentrações de aldicarb utilizadas neste experimento foi baseada inicialmente nos experimentos realizados por Soloneski et al. (2001) que avaliaram os efeitos *in vitro* da exposição de linfócitos humanos a um carbamato (zineb) e a sua formulação comercial, utilizando concentrações a partir de 0,1 µg/ml. Assim, no presente experimento, empregou-se as seguintes concentrações do produto comercial Temik®: 50 µM, 5 µM, 0,5 µM ou 0,05 µM (isto é, 0,001 a 10 µg/ml). A fim de se excluir a possível ação dos excipientes usados no produto comercial sobre a indução de necrose/apoptose de leucócitos, empregou-se diluições do padrão técnico do aldicarb (99,7% pureza), com idênticas concentrações (50 µM, 5 µM, 0,5 µM ou 0,05 µM). O período de incubação foi de 12 horas. O estudo *in vitro* foi feito em sextuplicata, conforme descrito no item 4.2.4.10.

A tabela 25 apresenta os resultados encontrados neste experimento. Nota-se que, em relação ao padrão técnico, todas as concentrações empregadas foram capazes de induzir a apoptose de leucócitos de maneira superior àquela do grupo controle, sendo a diferença considerada significativa nas concentrações de 50 µM, 5 µM e 0,5 µM [F(8,45)=36,50; p<0,05]. O mesmo pôde ser observado com as quatro concentrações do Temik® testadas, sendo encontrada significância estatística as concentrações de 50 µM e 0,5 µM [F(8,45)=36,50; p<0,05) – figura 54.

Considerando as células em apoptose final e/ou em necrose, a porcentagem encontrada para as células expostas ao padrão ou ao produto comercial contendo o praguicida foi superior ao observado no grupo não tratado (controle), sendo a diferença considerada significativa para todas as concentrações testadas, exceto a de 0,5 µM do padrão técnico [F(8,45)=29,485; p<0,05) – figura 55.

Em todas as concentrações testadas, a principal alteração observada foi a grande porcentagem de células em necrose, sendo a diferença em relação ao grupo controle considerada significativa [F(8,45)=517,56; p<0,05) em todas as concentrações do padrão técnico e do produto comercial testadas (figura 56). Além disso, observa-se que, em relação as células expostas ao padrão técnico, a porcentagem de células necróticas, em cada concentração testada, é sempre superior (e estatisticamente significantes nas três maiores concentrações – Tabela 26) naquelas expostas ao produto comercial.

Comparando-se entre si as concentrações testadas, diferenças significantes foram também encontradas, como mostra a tabela 26. Assim, pode ser observado, de forma especial, que a indução da necrose foi dose-dependente até a concentração de 0,5 μM ; entretanto, as maiores porcentagens de células necróticas foram observadas nas menores concentrações testadas (0,05 μM), tanto do padrão técnico quanto do comercial.

Tabela 25 – Morte celular (apoptose/necrose) de leucócitos após o tratamento *in vitro* por 12 horas com diferentes concentrações do padrão técnico do aldicarb ou do produto comercial (Temik®). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6 por grupo)

Grupos	Evento (%)			
		Apoptose	Apoptose final ou necrose	Necrose
Controle		0,70 $\pm$ 0,15	0,30 $\pm$ 0,10	3,27 $\pm$ 0,80
Padrão técnico	50 μM	4,50 $\pm$ 0,95 ^a	6,50 $\pm$ 0,90 ^a	36,85 $\pm$ 2,50 ^a
	5 μM	3,11 $\pm$ 0,70 ^a	3,10 $\pm$ 0,83 ^b	23,30 $\pm$ 3,50 ^a
	0,5 μM	3,00 $\pm$ 0,84 ^a	1,81 $\pm$ 0,60	14,90 $\pm$ 2,00 ^a
	0,05 μM	1,30 $\pm$ 0,54	6,10 $\pm$ 1,60 ^a	75,35 $\pm$ 2,15 ^a
Temik®	50 μM	3,00 $\pm$ 0,80 ^a	5,90 $\pm$ 1,31 ^a	67,40 $\pm$ 2,72 ^a
	5 μM	1,40 $\pm$ 0,63	3,00 $\pm$ 0,97 ^c	59,83 $\pm$ 2,80 ^a
	0,5 μM	6,60 $\pm$ 1,00 ^a	9,25 $\pm$ 2,32 ^a	45,00 $\pm$ 5,65 ^a
	0,05 μM	1,90 $\pm$ 0,54	5,00 $\pm$ 1,16 ^a	78,00 $\pm$ 1,74 ^a

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: ^a p<0,001 em relação ao controle; ^b p<0,01 em relação ao controle; ^c p<0,05 em relação ao controle

Tabela 26 – Diferenças estatísticas encontradas na avaliação da apoptose/necrose de leucócitos expostos *in vitro* a diferentes concentrações (μM) do padrão técnico do aldicarb (A) ou ao seu produto comercial (T). Anova seguida do teste Tukey-Kramer: $p < 0,05$

	A50	T50	A5	T5	A0,5	T0,5
Apoptose	T50	T5	T5	A0,5	T0,5	A0,05
	A5	T0,5	T0,5	T0,5	A0,05	T0,05
	T5	A0,05	A0,05			
	A0,5					
	T0,5					
	A0,05					
	T0,05					
Apoptose/necrose	A5	A5	T0,5	T0,5	T0,5	A0,05
	T5	T5	A0,05	A0,05	A0,05	T0,05
	A0,5	A0,5			T0,05	
	T0,5	T0,5				
Necrose	T50	A5	T5	A0,5	T0,5	A0,05
	A5	T5	A0,5	T0,5	A0,05	T0,05
	T5	A0,5	T0,5	A0,05	T0,05	
	A0,5	T0,5	A0,05	T0,05		
	T0,5	A0,05	T0,05			
	A0,05	T0,05				
	T0,05

Figura 54 – Apoptose de leucócitos após tratamento *in vitro* por 12 horas com diferentes concentrações (μM) do padrão técnico do aldicarb (A) ou do produto comercial (T). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões. N = 6 por grupo. Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,001$ em relação ao controle

Figura 55 – Apoptose final/necrose de leucócitos após tratamento *in vitro* por 12 horas com diferentes concentrações (μM) do padrão técnico do aldicarb (A) ou do produto comercial (T). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões. N = 6 por grupo. Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,001$ em relação ao controle; ** $p < 0,01$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação ao controle

Figura 56 – Necrose de leucócitos após tratamento *in vitro* por 12 horas com diferentes concentrações (μM) do padrão técnico do aldicarb (A) ou do produto comercial (T). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões. N = 6 por grupo. Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,001$ em relação ao controle

5.2.13 Experimento 13: Avaliação *in vitro* da morte de hepatócitos por necrose/apoptose – estudo por citometria de fluxo

A escolha das concentrações de aldicarb utilizadas neste experimento foi baseada inicialmente nos estudos sobre a sulfoxidação do aldicarb realizados em microsomas hepáticos após a exposição *in vitro* a este praguicida, como os de Pelekis e Krishnan (1997), utilizando as concentrações de 5 e 10 μM e nos de Perkins, El-Alfy e Schlenk (1999), que usaram concentrações a partir de 33 μM . Nenhum trabalho específico avaliando a ação do aldicarb na indução de apoptose e necrose de hepatócitos foi encontrado na literatura. Assim, no presente experimento, foram empregadas as seguintes concentrações do produto comercial Temik[®]: 50 μM , 5 μM ou 0,5 μM .

A fim de se excluir a possível ação dos excipientes usados no produto comercial sobre a indução de necrose/apoptose de leucócitos, diluições do padrão técnico do aldicarb (99,7% pureza), com idênticas concentrações, ou seja, 50 μM , 5 μM ou 0,5 μM , também foram utilizadas. O tempo de incubação foi de 24 horas. O estudo *in vitro* foi feito em sextuplicata, conforme descrito no item 4.2.4.11.

A tabela 27 mostra os resultados obtidos na avaliação da apoptose *in vitro* de hepatócitos expostos a diferentes concentrações do carbamato aldicarb, tanto do produto comercial, como do padrão técnico.

A análise dos dados apresentados na tabela 27 mostra que o aldicarb induziu ao aumento da ocorrência de apoptose em todas as concentrações testadas, em relação ao grupo controle, sendo esta diferença considerada significativa estatisticamente nas concentrações de 50 μM e 0,5 μM do padrão técnico e 50 μM e 5 μM [$F(6,35)=4,717$; $p<0,05$] do produto comercial. Não foram encontradas diferenças significantes entre a porcentagem de hepatócitos apoptóticos entre os grupos tratados com o produto comercial e o padrão técnico – figura 57.

Em relação aos hepatócitos em apoptose final e /ou necrose, uma porcentagem maior destes eventos foi observada nas células expostas ao produto comercial nas concentrações de 5 μM e 0,5 μM . Nesta última concentração, a diferença foi considerada significativa em relação ao controle e também em relação a todas as concentrações do padrão técnico do aldicarb e à concentração de 50 μM do Temik[®] [$F(6,35)=4,826$; $p<0,05$] – figura 58.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as porcentagens de hepatócitos necróticos expostos a diferentes concentrações do praguicida e o grupo controle [F(6,35)=0,7279; p>0,05].

A figura 59 ilustra um gráfico de pontos obtido com uma das amostras do grupo controle, uma do grupo A50 e uma do grupo T50.

Tabela 27 – Morte celular (apoptose/necrose) de hepatócitos após o tratamento *in vitro* por 24 horas com diferentes concentrações do padrão técnico do aldicarb ou do produto comercial (Temik[®]). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões (N = 6)

Grupos	Evento (%)			
	Apoptose		Apoptose final ou necrose	Necrose
Controle		5,27 ± 2,27	5,40 ± 1,40	1,73 ± 1,13
Padrão técnico	50µM	20,00 ± 5,40 ^a	4,26 ± 1,21 ^c	1,34 ± 0,12
	5µM	12,70 ± 3,00	5,00 ± 1,00 ^c	1,41 ± 0,10
	0,5µM	17,80 ± 5,00 ^b	5,21 ± 2,45 ^c	1,40 ± 0,15
Temik [®]	50µM	15,10 ± 3,56 ^a	5,60 ± 2,00 ^c	1,50 ± 0,30
	5µM	22,00 ± 13,00 ^a	7,00 ± 1,41	1,32 ± 0,30
	0,5µM	12,20 ± 3,00	8,70 ± 2,00 ^b	1,70 ± 0,34

Anova seguida do teste Tukey-Kramer: ^a p<0,01 em relação ao controle; ^b p<0,05 em relação ao controle; ^c p<0,01 em relação a concentração de 0,5 do Temik[®]

Figura 57 – Apoptose de hepatócitos após tratamento *in vitro* por 24 horas com diferentes concentrações (μM) do padrão técnico do aldicarb (A) ou do produto comercial (T). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões. N = 6 por grupo. Anova seguida do teste Tukey-Kramer: * $p < 0,01$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação ao controle

Figura 58 – Apoptose final/necrose de hepatócitos após tratamento *in vitro* por 24 horas com diferentes concentrações (μM) do padrão técnico do aldicarb (A) ou do produto comercial (T). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões. N = 6 por grupo. Anova seguida do teste Tukey-Kramer: # $p < 0,01$ em relação a concentração de 0,5 do Temik®; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

File: Anex 24h Ctr.004

Quad	% Total
UL	1.64
UR	6.85
LL	86.98
LR	4.53

File: Anex A50.018

Quad	% Total
UL	0.51
UR	5.10
LL	77.28
LR	17.12

File: Anex 24h T50.008

Quad	% Total
UL	0.72
UR	6.68
LL	77.29
LR	15.31

Figura 59 – Porcentagem de células viáveis (LL), apoptóticas (LR), necróticas (UL) e em necrose/apoptose final (UR) de um dos tubos controle (Ctr), um do padrão do aldicarb (A50) e do produto comercial (T50), com seus respectivos gráficos de pontos, com seus quatro quadrantes. Notar a diferente distribuição das células vivas (a), apoptóticas (b), necróticas (c) e em necrose/apoptose final (d) entre o grupo controle e os grupos experimentais

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Será apresentada a seguir a discussão sobre os resultados encontrados no estudo das alterações microscópicas observadas em cães e gatos intoxicados por aldicarb, bem como daqueles observados na intoxicação experimental por aldicarb em camundongos.

6.1 Intoxicação por aldicarb em cães e gatos: estudo das alterações microscópicas

O aldicarb é um carbamato extremamente tóxico, de uso restrito na agricultura, mas que tem sido utilizado ilegalmente como raticida doméstico e como agente tóxico de escolha para matar principalmente animais de companhia. Em nossos trabalhos anteriores, foi encontrada uma prevalência de 91,5% (214/234) de casos de intoxicação por este agente, considerando-se os óbitos por toxicose nestas duas espécies, sendo em cães responsável por 89,0% (113/127) dos casos e, em gatos, por 94,4% (101/107) (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007).

No presente trabalho, foram avaliados 100 casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos (N = 50 para cada espécie), com o objetivo de descrever e classificar as alterações microscópicas, visando colaborar para a tomada das decisões sobre o tratamento dos pacientes e auxiliar no diagnóstico definitivo dos casos de intoxicação por este carbamato.

Todas as alterações histopatológicas encontradas possuíam natureza circulatória e/ou degenerativa, sendo os principais órgãos acometidos os pulmões, o fígado e os rins, em ambas as espécies. Alterações menos freqüentes foram também observadas no cérebro, cerebelo, pâncreas, coração, baço, timo, linfonodos, intestino delgado e estômago (nestes dois últimos, apenas em cães), sendo todas elas representadas por congestão e/ou hemorragia. Tais resultados são, portanto, complementares aos nossos estudos anteriores que caracterizaram as alterações necroscópicas da intoxicação por aldicarb em cães e gatos (XAVIER, 2004).

Nos pulmões, a principal alteração microscópica encontrada foi a congestão pulmonar, tanto em cães (78,0%), como em gatos (88,0%). Nos cães, em segundo lugar, observou-se a ocorrência de hemorragia pulmonar (74,0%), seguido do edema (62,0%);

já em felinos, foi observado edema (76,0%) e, em terceiro lugar, a hemorragia pulmonar (52,0%).

Estes resultados mostram que o pulmão é o órgão mais afetado no quadro de intoxicação por aldicarb, provavelmente em consequência dos efeitos muscarínicos deste agente sobre o sistema respiratório, potencializados pelas alterações cardíacas agudas comumente observadas nos animais intoxicados. Além disto, as alterações respiratórias encontradas podem ser responsáveis também pelo quadro congestivo observado em diversos órgãos, sendo a hemorragia decorrente das alterações hemodinâmicas e de um possível efeito “endoteliotóxico” do aldicarb (MOHAMED; ADAM, 1990).

Quanto ao edema pulmonar, dois mecanismos principais podem estar envolvidos, que são a combinação do aumento das secreções traqueobrônquicas (OLIVEIRA; MENEZES, 2003) com as alterações na homeostase celular induzidas pela insuficiência circulatória, resultando na lenta exsudação do líquido para os alvéolos, bem como lesão direta no endotélio do capilar pulmonar (CHEVILLE, 1994).

No mesmo sentido, Moraes (1999), que avaliou 40 pacientes humanos intoxicados por aldicarb, afirmou que a insuficiência respiratória é provavelmente a complicação mais séria das intoxicações por carbamatos e organofosforados, sendo a sua patogênese multifatorial e relacionada à excessiva secreção brônquica, broncoespasmo, edema pulmonar, pneumonias por aspiração, paralisia da musculatura respiratória e ação central.

Ainda considerando o sistema respiratório, foi encontrado o enfisema pulmonar, mais freqüente em gatos (10,0%), que em cães (6,0%). A alteração menos comum foi a atelectasia, com um caso em cada uma das espécies estudadas. O enfisema pulmonar em animais ocorre sempre secundariamente à obstrução do fluxo de ar (no caso do aldicarb, causado pelo aumento das secreções brônquicas e pelo edema), sendo o enfisema alveolar caracterizado pela distensão e ruptura das paredes alveolares com a formação de bolhas de ar no parênquima pulmonar. A atelectasia é a distensão incompleta dos alvéolos e, no caso da forma adquirida, a simples presença de líquidos, obstruindo a passagem aérea, pode causar este tipo de lesão (LÓPEZ, 1998).

As alterações pulmonares encontradas neste estudo corroboram com aquelas descritas por outros autores que afirmam que a causa imediata para a morte por agentes anticolinesterásicos é a asfíxia resultante da insuficiência respiratória, contribuindo para este efeito os sinais nicotínicos, como a fraqueza muscular, os tremores e as

fasciculações, e os sinais muscarínicos sobre a musculatura lisa e cardíaca e glândulas exócrinas, promovendo, entre outros, a broncoconstrição e o aumento das secreções brônquicas (CHEVILLE, 1994; FISHEL, 2005). Além disso, distúrbios pulmonares têm efeito notável nas trocas gasosas, podendo resultar em acidose e hipoxemia, além de ter impacto sobre numerosos órgãos devido à congestão passiva e edema generalizado (LÓPEZ, 1998). Além disso, quando há grande prejuízo das funções cardiorrespiratórias, a evolução dos sinais clínicos para o quadro de choque é um evento possível e que deve ser considerado na terapêutica das intoxicações (OLSON, 1999).

O segundo órgão mais acometido por alterações microscópicas, em ambas espécies, foi o fígado. A congestão foi a alteração mais referida (72,0% em cães e 86,0% em gatos), seguida da degeneração vacuolar (46,0% em cada espécie) e da hemorragia (10,0% em cães e 4,0% em gatos). Nos rins, a congestão também foi a alteração mais frequente (64,0% em cães e 78,0% em gatos), seguida da hemorragia (26,0% em cães e 30,0% em gatos) e da nefrose (26,0% em cães e 14,0% em gatos).

Nestes órgãos, pode-se sugerir que as alterações circulatórias podem ser decorrentes da congestão passiva promovida pelas alterações cardíacas e pulmonares, sendo os efeitos degenerativos resultantes da hipóxia causada pela estase sanguínea, bem como a ação tóxica do aldicarb e de seus metabólitos sobre as células hepáticas e renais. Nesse sentido, sabe-se que a formação de metabólitos do aldicarb se dá principalmente em tecido hepático, dado ao volume de distribuição do órgão, mas também em rins e pulmões, sendo que a eliminação do agente tóxico pode ser limitada pela diminuição do fluxo sangüíneo, mas não pela saturação das enzimas relacionadas a sua biotransformação, mesmo em doses letais (PELEKIS; KRISHNAN, 1997).

Além disso, como citado anteriormente, contribuindo para as alterações sistêmicas observadas, estão os efeitos do choque circulatório, resultante da incapacidade generalizada do sistema circulatório em perfundir adequadamente as células com oxigênio e nutrientes na presença da superestimulação colinérgica (JONES; HUNT; KING, 2000). Neste sentido, o fígado é um órgão bastante afetado pelo choque, devido à hipóxia associada à estase, resultando na degeneração dos hepatócitos e no prejuízo dos mecanismos de detoxificação, no caso dos animais sobreviventes. Já nos rins de cães e gatos em choque, há degeneração e necrose pela isquemia causada pela vasoconstrição renal reflexa (THOMSON, 1983).

Na literatura há poucos relatos sobre as alterações microscópicas encontradas em animais intoxicados com aldicarb e as encontradas relatam principalmente a presença de

alterações circulatórias, especialmente nos pulmões. Neste sentido, foi relatada a presença de severo edema alveolar agudo difuso em ovelhas que vieram a óbito após exposição ao aldicarb (DORMAN et al., 1992) e, em vacas, áreas de hemorragia alveolar e edema intralobular discreto (KERR et al., 1991).

Em intoxicação experimental com o aldicarb em cabras, as principais alterações histopatológicas foram encontradas nos pulmões, fígado, rins, como observado neste nosso trabalho. No fígado, foi observada a congestão e a degeneração/necrose; nos rins, a nefrose e, nos pulmões, a hemorragia, o edema, a congestão e o enfisema (MOHAMED; ADAM, 1990).

Sabe-se que muitos fatores podem contribuir para o aumento da toxicidade dos diversos agentes tóxicos, incluindo aqueles ligados ao animal, como, por exemplo, a idade (OSWEILER, 1998; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006; OGA, 2003). Organismos jovens são muitas vezes mais sensíveis aos efeitos tóxicos dos praguicidas. Neste contexto, Moser (1999) em estudo piloto, observou que o aldicarb foi moderadamente mais tóxico para ratos jovens e que esta toxicidade estava principalmente relacionada com a taxa de inibição da acetilcolinesterase.

Da mesma forma, Vidair (2004) demonstrou que a neurotoxicidade produzida por organofosforados e pelo carbamato aldicarb é idade-dependente, adquirindo os filhotes maior resistência na medida em que progridem para a fase adulta. Observou estes efeitos em ratos, em relação à inibição da colinesterase cerebral (2,4 vezes maior que em adultos), à DL_{50} (1,8 vezes maior que em adultos) e à dose máxima de tolerância (1,9 vezes maior que em adultos), sendo esta última representada pela dose máxima em que os efeitos tóxicos são observados, sem a ocorrência de letalidade. Tais alterações foram mais evidentes nos protocolos que utilizaram a exposição aguda.

Considerando essas informações, buscou-se no presente trabalho avaliar comparativamente as alterações microscópicas, bem como a intensidade das mesmas em cães e gatos, nas diversas faixas etárias, avaliando os achados em filhotes (até 1 ano), adultos jovens (1,1 a 5 anos), adultos (5,1 a 7 anos) e idosos (com mais de 7,1 anos de idade).

No caso dos cães, predominaram as alterações intensas em pulmões, baço e coração de filhotes, pulmões e pâncreas de adultos jovens e em pulmões e fígado de idosos. Em pâncreas de filhotes, fígado, rins e cérebro de adultos e em rins, cérebro, cerebelo e pâncreas de idosos foram encontradas as três intensidades de alterações (isto é, discreta, moderada e severa) em frequências semelhantes. No fígado, rins, cérebro e

cerebelo de filhotes e de adultos jovens predominaram as lesões discretas, enquanto no timo e intestino de adultos jovens, apenas as discretas. Observando estes resultados, não foi possível constatar nenhuma relação entre a toxicidade do agente e a idade do animal, possivelmente devido à diferença entre as diversas doses de exposição. Por outro lado, o pulmão foi o órgão, em cães, que apresentou alterações severas em todas as faixas etárias.

Em filhotes de gatos, de forma geral, predominaram as alterações de intensidade discreta, com exceção dos rins, onde foram encontradas com a mesma frequência as lesões moderadas. Em adultos jovens as alterações de intensidade discreta foram as mais frequentes, sendo que, nos rins, foram encontradas alterações severas com a mesma frequência, nos pulmões, as moderadas e intensas e, no pâncreas foram observadas alterações nas três intensidades com frequências semelhantes. Em gatos adultos, predominou o quadro severo pulmonar e as demais alterações foram encontradas com intensidades variadas.

A avaliação da intensidade das alterações em adultos e idosos foi prejudicada pelo pequeno número de animais estudados, pois estes são menos curiosos e mais seletivos quando a ingestão de iscas contendo agentes tóxicos e talvez também pela menor representatividade destes indivíduos na população estudada.

Na análise semiquantitativa das principais alterações histopatológicas encontradas em pulmões (congestão, edema e hemorragia), fígado (congestão e degeneração vacuolar) e rins (congestão e hemorragia), de forma geral, não foram encontradas diferenças significativas entre as quatro faixas etárias. Entretanto, observou-se que a congestão renal foi mais intensa em adultos (com diferença significativa do grupo de adultos jovens) e que os animais idosos apresentaram o maior grau de intensidade da degeneração vacuolar hepática (com diferença significativa em relação aos adultos jovens). Tal alteração pode ser atribuída à diminuição na taxa de biotransformação hepática, causada pela deficiência do aparato enzimático em animais idosos.

6.2 Intoxicação experimental por aldicarb (Temik®) em camundongos

A fim de comparar os achados microscópicos observados em cães e gatos com aqueles encontrados em condições experimentais controladas, foi realizada a intoxicação de camundongos, visto ser esta espécie a utilizada nos ensaios biológicos para o diagnóstico das intoxicações por este carbamato (FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN, 2003). Além disso, os diversos experimentos realizados buscaram também avaliar a evolução dos sinais clínicos e as possíveis alterações sistêmicas após a exposição aguda grave ao aldicarb, durante um período de até 14 dias após a exposição.

Para tanto, inicialmente foi determinada a dose que seria utilizada em todos os demais experimentos *in vivo*, sendo o critério desejado a capacidade de induzir a um quadro de intoxicação severo sem, contudo, promover alta mortalidade. A dose determinada foi a de 0,08 mg/kg, que promoveu o aparecimento dos sinais clínicos da intoxicação pelo aldicarb e a morte de um em três animais expostos (33,0%). Os demais animais deste grupo se recuperaram sem tratamento.

Neste estudo, vale ressaltar que doses inferiores àquela preconizada como DL₅₀ oral para camundongos, de 1,0 mg/kg, até a dose de 0,09 mg/kg, promoveram o aparecimento dos sinais clínicos após cerca de 2 minutos e a morte de todos estes animais dentro de 2,6 a 4,7 minutos. A recuperação espontânea dos animais que receberam as doses de 0,08 mg/kg foi observada após 45 minutos a 2 horas após a exposição.

Dados da literatura mostram que a DL₅₀ oral do aldicarb para camundongos é de 0,30 a 1,5 mg/kg (WEXLER, 1998; GUIMARAES et al., 2005) e que a morte destes animais, após a exposição oral ao conteúdo gástrico contendo grânulos do praguicida, ocorre dentro de 5 a 15 minutos após episódios de convulsões clônicas intensas (FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN, 2003). Neste sentido, embora o tempo para a ocorrência do óbito encontrado no presente trabalho tenha sido inferior ao descrito na literatura, o mesmo quadro clínico foi observado, ou seja, todos os animais vieram a óbito após a ocorrência de uma ou mais convulsões do tipo tônico-clônica.

Os sinais clínicos observados em todos os camundongos expostos corresponderam àqueles clássicos descritos para os agentes anticolinesterásicos, destacando-se prostração, sialorréia, excitação, tremores, fasciculações, miose e

incoordenação motora. As convulsões foram observadas apenas precedendo a morte dos animais, ou seja, apenas os camundongos que convulsionaram vieram a óbito.

Em seres humanos, a maioria dos carbamatos não causa sinais clínicos exuberantes no SNC, como as convulsões; entretanto, quando esses sinais estão presentes, são considerados sinais de gravidade (CALDAS, 2000). Em nossos estudos anteriores, encontramos uma prevalência de 10,7% de convulsões entre os sinais clínicos descritos para cães e gatos intoxicados fatalmente pelo aldicarb (XAVIER, 2004).

Dados da literatura referem-se a exposição oral ao aldicarb produzindo quadro clínico severo, de rápido início e com sintomatologia que pode ser dividida em síndrome muscarínica (náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, sialorréia, lacrimejamento, miose, broncoconstrição, dispnéia, bradicardia, expectoração, incontinência urinária); síndrome nicotínica (tremores musculares e fasciculações, fraqueza muscular e/ou paresia a paralisia flácida a paralisia, taquicardia, hipertensão) e alterações centrais (depressão, alterações de comportamento, agitação, ataxia, hiperatividade e convulsões) (SREBOCAN et al., 2003). Além disso, são incluídas as manifestações cardíacas (arritmias, anormalidades eletrocardiográficas, defeitos de condução e alterações da pressão arterial) e hipotermia ligeira a moderada (ECOBICHON, 1996; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000; ANDRADE et al., 2002; SHARE et al., 2002; LOBO JR., 2003). A morte pode ocorrer em 15 minutos após a exposição, sendo a insuficiência respiratória a causa usual de morte após a intoxicação por carbamatos (FISHEL, 2005).

Quanto às alterações histopatológicas observadas nos camundongos que vieram a óbito logo após a exposição, apenas alterações congestivas discretas em pulmões, fígado e rins foram observadas, sugerindo que a morte pode ser atribuída à falha cardíaca aguda, isquemia e hipóxia severa, bem como ação direta sobre o SNC, levando a ocorrência de quadro convulsivo agudo e sempre fatal. Apesar da rapidez de indução da morte, a injúria tóxica aguda conduz ao edema celular imediato (CHEVILLE, 1994), o que pode explicar a degeneração vacuolar discreta observada em zona 3 (centrolobular) do fígado. Neste sentido, a isquemia pode ter contribuído para a ocorrência de degeneração hepática nestes animais, confirmada histologicamente pela ausência de celularidade inflamatória no tecido comprometido (COLLICCHIO ZUANAZE, 2006).

Com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição aguda grave ao aldicarb sobre parâmetros clínicos simples, como consumo de água, ração e ganho de peso, foi realizado o experimento 3, com a avaliação dos animais durante o período de até 14 dias após a intoxicação. Foi observado que o consumo de água em todos os grupos expostos foi superior durante os 5 primeiros dias e inferior ao consumo dos animais controle a partir do 10º dia até o final. Por outro lado, os camundongos expostos ao aldicarb consumiram menor quantidade de ração do que os não expostos, em todos os dias avaliados, com exceção dos dias 7 e 14, quando o consumo foi semelhante.

O peso corporal é um parâmetro bastante utilizado na avaliação da toxicidade de uma determinada substância no organismo animal (HUEZA, 2006; MOREIRA, 2007). No presente estudo, o ganho de peso dos camundongos expostos ao aldicarb somente foi semelhante àquele dos animais controle após o sétimo dia. Assim, tomando-se os resultados em conjunto do consumo de ração e do peso corpóreo, é possível sugerir que a recuperação do quadro clínico da intoxicação inicia-se, de fato, após a primeira semana após a exposição, com o consumo alimentar e, conseqüentemente, o ganho de peso retornando a normalidade neste período. Ainda, pode-se relacionar a polidipsia observada nos animais intoxicados (até o 5º dia) aos efeitos tóxicos do praguicida sobre o fígado e os rins, como ficou evidenciado nos demais experimentos que avaliaram a função e a integridade destes tecidos e que são discutidos a seguir.

Neste sentido, visando avaliar a recuperação sistêmica após a intoxicação aguda grave ao aldicarb, foram realizados alguns experimentos (experimentos 4 a 10) para a análise de parâmetros clínicos até o período de 14 dias, incluindo a avaliação após 24 e 48 horas da exposição, o 7º dia e o 14º dia.

Em relação aos achados de microscopia óptica (experimento 4), alterações semelhantes às descritas neste trabalho para os cães e gatos foram observadas no que diz respeito à toxicidade pulmonar, hepática e renal do aldicarb e a natureza das lesões. Entretanto, as alterações pulmonares (congestão, edema e hemorragia) foram observadas apenas nas primeiras 48 horas após o quadro agudo (prevalecendo a congestão) e a intensidade das mesmas foi considerada sempre discreta. Tais resultados já podiam ser esperados, visto que a ocorrência de toxicidade pulmonar aguda grave promoveria quadro de hipóxia severo que culminaria certamente com o óbito destes animais.

As alterações patológicas que se desenvolvem em resposta a injúria dependem da duração do efeito, do agente causador e de sua concentração no tecido, da irrigação

vascular e do fluxo sanguíneo para a célula, incluindo a disponibilidade de oxigênio, e das características metabólicas e estruturais da célula. As células metabolicamente ativas são, de modo geral, mais suscetíveis à injúria (CHEVILLE, 1994; MYERS; MCGAVIN, 2007), por isso os padrões de degeneração serem tão significantes no fígado e nos rins dos animais expostos a diversos agentes tóxicos, como o aldicarb.

Em relação às alterações hepáticas, a congestão foi observada até o 7º dia após a exposição e a recuperação das alterações foi progressiva, sendo observada em 60% dos animais nas primeiras 24 horas, em 40% após 48 horas e apenas em 10% (um animal) no 7º dia. Já a degeneração vacuolar foi observada em todos os animais avaliados, tanto do grupo controle, como dos expostos. Porém, a intensidade destas alterações foi distinta, sendo a diferença considerada significativa nas primeiras 48 horas, em relação ao grupo controle e aos grupos 7 e 14 dias. Embora certo grau de degeneração tenha sido observado de forma difusa pelo tecido hepático, pode-se notar que a maior intensidade da vacuolização hepática estava localizada em região próxima a veia centrolobular (zona 3), constituindo a alteração hepática conhecida como degeneração zonal.

Partindo-se do fato de que as alterações mais evidentes foram observadas nos animais após 24 e 48 horas da exposição, foi realizado o estudo do tecido hepático e renal por meio da microscopia eletrônica de transmissão (experimento 5).

A avaliação hepática demonstrou a presença de edema celular após 24 horas da exposição, com a presença de tumefação citoplasmática e mitocondrial. De forma interessante, após 48 horas da exposição, os hepatócitos mostraram a presença de diversos vacúolos citoplasmáticos, de diferentes tamanhos, com conteúdo semi-translúcido.

Considerando-se os tipos de degeneração celular aguda, sabe-se que a vacuolização celular observada em células lesadas pode ser resultante do edema celular (acúmulo de água no citoplasma), da degeneração gordurosa ou do acúmulo de glicogênio (MYERS; MCGAVIN, 2007). Apesar das alterações morfológicas observadas à microscopia eletrônica sugerirem que os hepatócitos dos animais do grupo 24 horas apresentavam edema celular e, possivelmente a degeneração gordurosa no grupo de 48 horas, foi realizada a histoquímica para glicogênio e para a gordura, de forma a esclarecer definitivamente qual a alteração envolvida (experimento 6). No caso de ser negativa para ambas as colorações, por exclusão, a alteração envolvida seria o edema celular.

Neste sentido, os resultados encontrados para o glicogênio foram negativos tanto para o grupo controle, como para os experimentais. No caso da histoquímica para gordura, o grupo 24 horas foi negativo, indicando, portanto, degeneração hidrópica dos hepatócitos. Por outro lado, apenas os hepatócitos dos animais do grupo 48 horas mostraram-se positivos para gordura, indicado pela coloração enegrecida dos vacúolos citoplasmáticos. Vale ressaltar que a degeneração gordurosa é uma resposta comum a muitas hepatotoxinas, sendo muitas vezes reversível e não promovendo a morte do hepatócito (BURNS; MEADE; MUNSON, 1996).

Os aspectos fisiopatológicos das lesões tóxicas e isquêmicas do fígado são facilmente explicáveis tendo-se o ácino como subunidade anatômica, o qual é caracterizado pelos ramos da veia porta e artéria hepática no centro e a veia centrolobular (VCL) na periferia. No fígado, os hepatócitos organizam-se em placas ramificadas, separadas entre si pelos sinusóides que se arranjam radialmente ao redor da VCL. O sangue flui dos ramos da artéria hepática e da veia porta desde os espaços-porta até a VCL.

A degeneração zonal hepática é aquela que afeta hepatócitos dentro de áreas definidas do órgão, como observado no presente estudo. Hepatócitos degenerados estão tumefeitos e quando a maioria daqueles contidos em uma zona estão afetados, aquela porção do lóbulo aparece pálida. Embora a alteração zonal tipicamente produza um padrão lobular acentuado, usualmente é necessário o exame microscópico para se determinar o tipo de alteração zonal (MACLACHLAN; CULLEN, 1998).

A degeneração zonal centrolobular é particularmente comum, uma vez que esta parte do lóbulo, por receber o sangue menos oxigenado, fica mais suscetível a hipóxia. Além disso, o local da agressão celular tóxica dentro do ácino hepático reflete o local da biotransformação química (MACLACHLAN; CULLEN, 1998). Sendo assim, a região centrolobular tem a maior atividade enzimática (sistema oxidase de função mista ou citocromo P-450), a qual está envolvida na biotransformação de substâncias tóxicas (MACLACHLAN; CULLEN, 1998), incluindo o aldicarb. Neste sentido, vale destacar que a sulfoxidação do aldicarb é considerada como um processo de bioativação, visto que o composto primariamente por ela formado, o ALX, é mais potente do que a substância original em relação à inibição da acetilcolinesterase (PELEKIS; KRISHNAN, 1997). Sugere-se, assim, que a formação deste metabólito tóxico pode ter contribuído para as alterações hepáticas observadas neste experimento.

Em formas suaves de hipóxia ou pela ação de agentes tóxicos, os hepatócitos das áreas periacinares (zona 3) podem apresentar degeneração gordurosa, pois esta região é a menos oxigenada e a capacidade das células de metabolizar lipídeos se apresenta reduzida, além de haver a diminuição na formação e/ou exportação de lipoproteínas pelos hepatócitos e decréscimo na oxidação de ácidos graxos no interior destas células (THOMSON, 1983; MACLACHLAN; CULLEN, 1998; FABRIS, 2006). A própria congestão passiva do fígado, com a estase do sangue, deve ter contribuído para agravar a ocorrência de hipóxia nas áreas centrolobulares.

Em relação às alterações histopatológicas encontradas nos rins, foram observadas hemorragia, principalmente em animais do grupo 24 horas, congestão, nos grupos 24 e 48 horas e diferentes graus de degeneração em todos os grupos estudados. A degeneração tubular foi considerada quando havia a presença de tumefação celular e a nefrose, quando esta alteração estava acompanhada de descamação celular, por vezes de grande intensidade e com a presença de cilindros hialinos. Como notado no tecido hepático, a intensidade das alterações foi considerada diferente estatisticamente nos grupos 24 e 48 horas, em relação aos demais grupos experimentais, demonstrando recuperação tecidual após 7 dias da exposição. A microscopia eletrônica dos camundongos destes grupos expôs em detalhes tais alterações degenerativas, mostrando células tubulares tumefeitas, com edema mitocondrial, descamação e presença de conteúdo na luz tubular, alterações estas que ficaram mais evidenciadas nos animais do grupo 48 horas.

Neste contexto, a eliminação dos metabólitos do aldicarb pela via renal pode ter exercido papel importante na indução da nefrose tubular, caracterizada pela vacuolização, desestruturação e descamação das células tubulares, bem como pela presença de cilindros, alterações estas visualizadas tanto na microscopia óptica, quanto na eletrônica. Tal achado foi também descrito em aves para outro praguicida com excreção renal, o 2,4-D (MORGULIS et al., 1998).

Os túbulos renais respondem à agressão por meio de degeneração celular, necrose e atrofia (CONFER; PANCIERA, 1998). A doença tubular pode ser resultado do dano epitelial tubular em consequência de infecção, agressão tóxica direta ou isquemia. A ação de substâncias nefrotóxicas causa dano à membrana plasmática ou à mitocôndria. Quando os néfrons são perdidos devido à injúria, os túbulos remanescentes são capazes de hipertrofia compensatória, que mantém, de modo geral, a função renal.

Particularmente em resposta a toxinas, o epitélio tubular pode regenerar e restabelecer a função (CONFER; PANCIERA, 1998).

O aspecto microscópico da lesão tubular aguda depende da gravidade do insulto, da sua duração e do período de tempo entre a exposição e a recuperação ou morte do indivíduo. O epitélio pode apresentar-se tumefeito, com citoplasma vacuolizado ou com aspecto eosinofílico intenso, nos casos de necrose. Os túbulos podem conter detritos celulares necróticos e cilindros hialinos ou granulares (CONFER; PANCIERA, 1998).

Em um modelo experimental de necrose tubular causada pelo cloreto de mercúrio foi observada evidência morfológica de regeneração dos túbulos contorcidos próximos 3 dias após o insulto tóxico, sendo de 21 a 56 dias o tempo necessário para que a estrutura renal esteja normal, sem evidência de exposição à nefrotoxina (CONFER; PANCIERA, 1998). Estes dados reforçam que a adoção de medidas para evitar a ocorrência de uremia fatal, como a fluidoterapia intensiva, bem como a avaliação periódica da função renal, no tratamento das intoxicações nefrotóxicas agudas, é fundamental para a melhora do prognóstico (JONES; HUNT; KING, 2000).

Em um trabalho realizado em camundongos expostos a alface tratada com fungicidas carbamatos durante 13 semanas, as alterações macro- e microscópicas encontradas foram: aumento do peso do fígado, congestão e degeneração gordurosa em fígado e rins, infiltrado inflamatório mononuclear em fígado e necrose hepática em alguns animais. Tais alterações foram atribuídas à diminuição da atividade metabólica hepática e à excreção de metabólitos pela via renal (OZBAY; BARLAS; KOLANKAYA, 1991), sugerindo estes fatores podem também ter participado na indução das alterações observadas nos animais expostos ao aldicarb no presente estudo.

Além da avaliação clínica, necroscópica, histopatológica e ultraestrutural, o estudo dos efeitos tóxicos de determinado agente sobre o organismo de um animal pode também ser realizado por meio de avaliação hematológica e bioquímica, fornecendo critérios para a discussão de sua toxicidade sobre diversos sistemas, bem como subsídios para o tratamento adequado do quadro agudo da intoxicação. Considerando a possível contribuição clínica trazida pela caracterização dos efeitos tóxicos do aldicarb em animais gravemente intoxicados, foram realizados os experimentos 7 (avaliação do hemograma) e 8 (bioquímica sérica – avaliação da função hepática, renal, pancreática e lesão muscular cardíaca).

Alguns relatos de intoxicação por aldicarb e outros carbamatos em seres humanos citam a ocorrência de alterações no hemograma, incluindo o aparecimento de

leucocitose ou leucopenia reversíveis, sem, contudo, levantar os possíveis mecanismos envolvidos neste tipo de observação (GARBER, 1987; MORAES, 1999; CALDAS, 2000).

No presente estudo, foi verificado que os camundongos do grupo 24 horas apresentaram as menores contagens de hemácias, além dos maiores VCM e HCM e valores normais de CHCM. Podem ter contribuído para a redução do número de hemácias após 24 horas da exposição o deslocamento de maior contingente de células vermelhas para os tecidos congestos, bem como a ocorrência de hemorragia. A meia vida de eritrócitos de pequenos roedores varia de 45 a 68 dias, sendo em seguida destruídas no baço (SMITH, 1996; CAMPBELL, 2007), de forma que alterações significativas no número de hemácias em resposta a toxicidade medular aguda não poderiam ser observadas em apenas 24 horas.

Os camundongos do grupo 24 horas tiveram também um dos maiores valores de hematócrito, com redução deste parâmetro no grupo 48 horas. Em perdas agudas de sangue e em condições de excitação (como estímulo provocado pela epinefrina) pode haver contração esplênica e temporária elevação do hematócrito, sem aumento paralelo das proteínas plasmáticas (MEYER; COLES; RICH, 1995), podendo isso explicar os achados do grupo 24 horas.

Por outro lado, a diminuição da tensão de oxigênio nos rins estimula a produção de eritropoietina por este órgão, o qual, por sua vez, induz a produção de células vermelhas (proeritroblastos) pela medula óssea; são então lançados reticulócitos na circulação sangüínea, os quais tornam-se maduros dentro de 24 a 48 horas (SMITH, 1996). Neste contexto, pode-se sugerir que o aumento no número de hemácias observado já a partir de 48 horas após a toxicose aguda ser decorrente do aumento da síntese, em decorrência da hipóxia renal.

Vale lembrar que o tecido sangüíneo se caracteriza por sua alta taxa de renovação e por sua flexibilidade e adaptação frente a diferentes situações fisiopatológicas (FOCK, 2005). Os órgãos hematopoiéticos têm capacidade de aumentar a produção e acelerar a maturação de uma ou várias populações de células como mecanismo de adaptação a condições fisiológicas ou patológicas (FOCK, 2005).

Por outro lado, apesar de ser difícil estabelecer valores hematológicos de referência para camundongos devido às diversas linhagens e métodos de coleta, os valores encontrados para os animais do grupo controle e para os animais expostos ao aldicarb encontram-se dentro dos valores de referência para camundongos, que são de

$8,3 \times 10^6/\text{mm}^3$ (variando de $6,5$ a $10,1 \times 10^6/\text{mm}^3$) para hemácias, de 40,4% (32,8 a 48,0%) para o hematócrito, de 49,1 fl (42,3 a 55,9 fl) para o VCM (exceção para o grupo 24 horas, onde o valor médio foi de 66,89 fl), de 15,9 pg (13,7 a 18,1 pg) para o HCM e de 32,3% (29,5-35,1%) para o CHCM (CAMPBELL, 2007).

As células do sistema imune são os leucócitos, células derivadas da medula óssea que incluem células mielóides (neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos), e os linfócitos. Para a avaliação destes diferentes tipos celulares, foi realizado o leucograma com contagem diferencial dos leucócitos circulantes. Foi observada redução significativa do número de leucócitos (leucopenia) dos camundongos dos grupos experimentais avaliados 24 horas, 48 horas e 7 dias após a exposição, quando comparado àqueles do grupo controle. Observou-se que o número de neutrófilos e de linfócitos estava reduzido significativamente nestes grupos, em relação ao grupo controle.

Comparando-se esses achados com os valores de referência de neutrófilos para camundongos, que são de $0,4$ a $2,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ (CAMPBELL, 2007), encontrou-se neutropenia evidente nos animais expostos ao aldicarb. Entretanto, vale ressaltar que Caldas (2000) relatou neutropenia e também a ocorrência de linfopenia nas intoxicações agudas por carbamatos.

Entre as causas de neutropenia listadas por Meyer, Coles e Rich (1995), e que poderiam aqui estar relacionadas, estão a reduzida sobrevivência de neutrófilos maduros (fazendo com que a demanda exceda a produção, com lançamento de células imaturas na circulação sanguínea) e/ou a reduzida produção pela medula óssea.

Neste sentido, quanto ao número de basófilos e monócitos, incluindo-se nestes dois últimos tipos celulares as alterações na contagem também dos animais do grupo 14 dias, observou-se redução do número destas células e, quanto ao número de eosinófilos, foi observada tendência à diminuição em todos os animais dos grupos experimentais. A granulocitopenia (redução do número de granulócitos – neutrófilos, basófilos e eosinófilos) é considerada como a mais comum manifestação de lesão quimicamente induzida à medula óssea, sendo menos provável a lesão química direta sobre estas células (SMITH, 1996).

Por outro lado, valores de referência para camundongos mostram que o número de basófilos pode variar de 0 a 0,02, o de eosinófilos de 0 a 0,17 e o de monócitos, de 0 a 0,29 (CAMPBELL, 2007). Neste sentido, os baixos valores encontrados destes tipos celulares podem não refletir qualquer alteração decorrente da exposição ao aldicarb. De

fato, a leucopenia é o resultado mais freqüente da neutropenia ou da linfopenia, já que os eosinófilos, monócitos e basófilos podem circular em quantidades tão pequenas que a sua diminuição não é suficiente para produzir uma leucopenia (GARCIA-NAVARRO, 2005).

Considerando-se que o aldicarb induz a leucopenia, poder-se-ia levantar dois questionamentos: seriam estes resultados um reflexo do efeito citotóxico agudo do aldicarb sobre leucócitos sanguíneos e sobre a medula óssea ou o resultado de uma redistribuição destas células para outros tecidos? Buscando esclarecer essas dúvidas, foram realizados ensaios clássicos de avaliação do sistema imune (peso relativo de órgãos e celularidade), bem como de avaliação *in vitro* da citotoxicidade do aldicarb sobre leucócitos de camundongos.

O experimento 9 avaliou os pesos relativos do timo, do baço e do fígado e a celularidade do baço de camundongos expostos ao aldicarb, com a obtenção destes parâmetros por até 14 dias após a exposição. Assim, foi observado aumento significativo no peso relativo do timo dos grupos avaliados após 24 e 48 horas da intoxicação pelo aldicarb, em relação ao grupo controle. Tal aumento pode ter sido resultante de alterações congestivas e/ou do maior deslocamento para este órgão de linfócitos imaturos da medula, secundário à diminuição dos linfócitos circulantes. O aumento do peso relativo do timo pode estar também relacionado ao aumento da proliferação das células linfocitárias, como descrito por Crespilho et al. (2006) num trabalho no qual avaliaram-se os efeitos do treinamento físico e tratamento com dexametasona sobre o sistema imune de ratos.

Em relação ao peso relativo do fígado, foram considerados significantes os resultados encontrados para os camundongos dos grupos 48 horas e 7 dias em relação ao grupo controle. O aumento do peso hepático nos animais 48 horas após a exposição pode ser atribuído a congestão e degeneração vacuolar hidrópica e/ou gordurosa observada histologicamente nestes animais. Contudo, em relação aos animais do grupo 7 dias, não foi encontrada nenhuma alteração histopatológica que explicaria o aumento de peso deste órgão.

Em relação ao baço, nenhuma alteração foi observada no peso relativo em todos animais dos grupos experimentais. Por outro lado, a celularidade deste órgão nos animais dos grupos 24 e 48 horas foi significativamente superior aos demais animais avaliados, podendo este efeito estar relacionado ao aumento do deslocamento de

linfócitos para este tecido, a partir da medula óssea, em virtude de destruição destas células circulantes, sem, contudo, promover alteração no peso relativo do baço.

A redução na celularidade da medula óssea tem freqüentemente causa idiopática, ou envolve a ação de agentes químicos, como medicamentos e praguicidas, vírus e exposição à irradiação (FOCK, 2005; THRALL; WEISER; JAIN, 2007). Com o objetivo de avaliar o possível efeito tóxico do aldicarb sobre as células da medula óssea, foi realizada a contagem destas células no experimento 10. Os resultados mostraram que os animais dos grupos 24 horas e 48 horas apresentaram os menores valores em relação a todos os grupos estudados, com diferença significativa em relação aos animais submetidos à eutanásia 7 dias após a exposição. Este resultado pode sugerir a ação citotóxica do praguicida sobre células medulares e células sanguíneas (gerando demanda maior de liberação de células a partir da medula), ocorrendo a recuperação medular 7 dias após a exposição ao agente tóxico.

Compostos que causam danos ou destroem a medula óssea são imunotóxicos, já que todos os progenitores derivam das células *stem* pluripotentes, presentes neste local (CARFI et al., 2007). Por outro lado, substâncias que não são mielotóxicas podem afetar linfócitos, que são os efetores primários e reguladores da imunidade adquirida. Paralelamente, o correto funcionamento do sistema imune depende da produção de citocinas, sendo que a alteração desta pode indicar que há ocorrência de imunomodulação (CARFI et al., 2007). Neste sentido, alguns trabalhos apresentam a ação citotóxica do aldicarb sobre linfócitos. Dean et al. (1990a) mostraram a ação do aldicarb alterando a responsividade de linfócitos T, de forma indireta, por reduzir a função de macrófagos, provavelmente, por diminuir a produção de interleucina 1.

Com o objetivo de avaliar se a leucopenia poderia estar relacionada a citotoxicidade aguda do aldicarb, realizou-se um estudo *in vitro* (experimento 12) para investigar a indução de apoptose, bem como de necrose, em leucócitos de camundongos. A fim de excluir a ação dos excipientes contidos no produto formulado, toda avaliação foi feita comparando-se também com o padrão técnico do aldicarb. Os resultados obtidos das porcentagens de células em necrose, apoptose final/necrose e em necrose sugerem que o aldicarb é capaz de induzir tanto apoptose em leucócitos em todas as concentrações avaliadas, bem como necrose. No caso da necrose foi observado efeito dose-dependente até a concentração de 0,5 μ M, sendo, entretanto, a menor concentração testada aquela que induziu a maior porcentagem de morte celular por necrose. Além disso, as células expostas ao produto comercial apresentaram as maiores

porcentagens de necrose, sugerindo a participação dos excipientes da formulação na indução deste efeito.

Lee e Ransdell (1984), estudando os níveis plasmáticos e teciduais do aldicarb e seus metabólitos, encontraram no sangue de um homem que veio a óbito após 2 horas da exposição ao aldicarb, 0,028 ppm de aldicarb (28 ng/ml) e 0,482 ppm de metabólitos sulfóxido e sulfona (482 ng/ml). Outros estudos que quantificaram no plasma o aldicarb em seres humanos intoxicados mostraram concentrações plasmáticas que variaram até 6,20 µg/ml (6.200 ng/ml) e, em animais, de cerca de 65 ng/ml (MONTESISSA et al., 1994; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000; TRACQUI et al., 2001; PROENÇA et al., 2004). Em dois cães intoxicados experimentalmente com 30 mg/kg de Temik[®], foram detectadas concentrações de 3,1 ng/ml (cão 1) e 13,9 ng/ml (cão 2) após 30 minutos da exposição e 6,4 ng/ml (cão 1) e 58,0 ng/ml (cão 2) após 3 horas; este último (cão 2) veio a óbito neste período (GUIMARAES et al., 2005). Neste sentido, a faixa de concentrações testadas no presente experimento (1 a 10.000 ng/ml) inclui valores plasmáticos passíveis de serem verificados *in vivo* em pacientes intoxicados. Portanto, os presentes achados permitem sugerir que o aldicarb, por ação direta, tem ação citotóxica, podendo induzir a morte de leucócitos circulantes (e possivelmente de células medulares) por mecanismos que envolvem a apoptose e a necrose.

O sistema imune, dentre todos, é o que apresenta a probabilidade máxima de exposição e susceptibilidade a agentes tóxicos (MOREIRA, 2007) e, dentre estes, os praguicidas carbamatos, como o carbaril e o aldicarb, têm sido reconhecidos como imunotóxicos (BURNS; MEADE; MUNSON, 1996). Por outro lado, parecem conflitantes os dados disponíveis na literatura sobre o aldicarb e o sistema imune, principalmente quando são consideradas as exposições crônicas a doses subletais, quando muitas vezes nenhum efeito é observado (THOMAS et al., 1990; THOMAS; RATAJCZAK, 1990; HONG, 1991)

Em camundongos expostos a água contaminada com concentrações superiores a 1 ppb de aldicarb, foi observada diminuição da *plaque-forming cell* e, de forma curiosa, esta alteração foi mais evidente na menor das concentrações avaliadas (OLSON, 1987). Outros estudos utilizando o mesmo método de avaliação também apontaram para os efeitos imunossupressores do aldicarb (SHIRAZI et al., 1990) e outros autores encontraram efeitos do aldicarb suprimindo a atividade de macrófagos (SELVAN et al., 1989; DEAN et al., 1990a; DEAN et al., 1990b).

A avaliação do sistema imune em peixes expostos agudamente a diversos organofosforados demonstrou também a ocorrência de leucopenia e linfopenia (SVOBODA et al., 2001). A indução de apoptose em leucócitos promovendo leucopenia já foi descrita com outros agentes tóxicos, que não os praguicidas, entre os quais as microcistinas e medicamentos (GONÇALVES et al., 2006; MOREIRA, 2007).

A realização da bioquímica clínica em estudos toxicológicos é uma importante ferramenta que auxilia na compreensão da fisiopatologia da intoxicação e também no diagnóstico de pacientes intoxicados. A correta escolha dos parâmetros a serem avaliados fornece subsídios importantes para a adequada avaliação do comprometimento de cada órgão ou sistema (HENRIQUE, 2005). Embora o aldicarb seja classificado como uma toxina sem efeitos carcinogênicos, reprodutivos ou teratogênicos, há referências deste praguicida alterando parâmetros hematológicos e bioquímicos (MORAES, 1999; CALDAS, 2000), como observado no presente trabalho.

As funções do fígado em vários processos corporais incluem a participação no metabolismo de carboidratos, de lipídeos e de proteínas, na desintoxicação de catabólitos e outras substâncias tóxicas, entre outras (LASSEN, 2007). Devido à importante função deste órgão em todos estes processos e considerando a sua participação fundamental na biotransformação do aldicarb e de seus metabólitos, buscou-se neste estudo identificar se haviam alterações nos testes bioquímicos hepáticos nos animais expostos ao aldicarb, durante até 14 dias após a intoxicação.

Os parâmetros utilizados para avaliar o fígado são divididos em testes de enzimas séricas e testes funcionais (substâncias produzidas, como a albumina, a uréia e a glicose; substâncias metabolizadas ou excretadas, como o colesterol). Os testes de enzimas séricas podem ser subdivididos naqueles que refletem lesão hepatocelular (enzimas AST e ALT) e nos que indicam aumento da produção enzimática (enzimas FA e GGT), conseqüente a colestase ou indução por drogas (MEYER et al., 1995; MOREIRA, 2007).

Quanto aos testes de enzimas séricas, nenhuma alteração importante foi encontrada nos valores de AST, ALT, GGT e FA, apesar das alterações histológicas encontradas nos animais expostos após 24 e 48 horas da exposição ao aldicarb. Quanto à avaliação das proteínas totais, albumina e globulinas foi observado aumento significativo após 7 dias da exposição e retorno a valores próximos aos do controle após 14 dias. A combinação de aumento de albumina e de globulinas reflete desidratação.

Este resultado não pôde ser explicado, visto que a avaliação do consumo de água destes animais no sétimo dia não mostrou diferença em relação ao consumo do grupo controle.

Aumento significativo nos níveis de glicose, em relação ao grupo controle, foi observado 24 horas após a exposição ao aldicarb. Em relação a este parâmetro, os camundongos do grupo de 7 dias foram os que apresentaram os menores valores.

Em crianças intoxicadas gravemente por anticolinesterásicos, foi observada a ocorrência de hiperglicemia, provavelmente secundária a indução de pancreatite (ALONZO; CORRÊA, 2003). Neste sentido, a hiperglicemia observada nos camundongos do grupo 24 horas pode estar relacionada à disfunção dos níveis da amilase encontrada nestes mesmos animais. Moraes (1999) e Ferreira et al. (1992) também observaram hiperglicemia em pacientes humanos intoxicados por aldicarb. Moraes relatou a ocorrência desta alteração em 76,9% (n = 40) dos pacientes, à entrada na emergência, com retorno aos valores normais ou próximos aos normais no segundo dia.

O estudo do metabolismo lipídico é feito por meio da avaliação da concentração sérica de triglicerídeos (principal forma de armazenamento de lipídeos) e colesterol. O conteúdo de triglicerídeos circulantes reflete o equilíbrio entre sua absorção no intestino delgado, sua síntese/secreção nos hepatócitos e sua deposição no tecido adiposo. E o colesterol tem seu equilíbrio na função hepática, já que o fígado é um importante órgão de síntese, catabolismo e excreção deste lipídeo (LASSEN; FETTMAN, 2007).

Os valores séricos de triglicérides dos camundongos dos grupos 24 e 48 horas apresentaram-se aumentados significativamente, em relação ao grupo controle e aos grupos 7 e 14 dias. Por outro lado, os níveis de colesterol mostraram-se reduzidos de forma significativa nos grupos 48 horas e 7 dias em relação aos demais. Neste contexto, o aldicarb parece exercer certo tipo de efeito sobre o metabolismo lipídico. A presença de hipertrigliceridemia, sem hipercolesterolemia, pode ser indicativo, entre outros, de pancreatite aguda e de nefrose (LASSEN; FETTMAN, 2007). Estas alterações são compatíveis de explicar as alterações no metabolismo de lipídeos, já que foram observadas também alterações significativas nos níveis de amilase no grupo 24 horas e alterações histológicas compatíveis com nefrose e aumento sérico de creatinina nos animais dos grupos 24 e 48 horas.

No estudo da função renal, que incluiu a mensuração da uréia e creatinina séricas, nenhuma alteração de importância clínica foi observada nos níveis de uréia; entretanto, houve aumento significativo da creatinina após 24 e 48 horas da exposição ao

praguicida, em relação aos demais grupos avaliados, confirmando a nefrotoxicidade observada nos achados de histopatologia. Neste sentido, a avaliação da função renal torna-se fundamental instrumento clínico de monitorização de pacientes intoxicados pelo aldicarb.

No exame da função pancreática exócrina, foi observado aumento significativo dos níveis da enzima amilase após 24 horas, em relação ao grupo controle, e nenhuma diferença nos níveis séricos da lipase entre os grupos experimentais. Estes resultados são semelhantes ao relatado em seres humanos por Moraes (1999), que encontrou aumento dos níveis desta enzima em 45,45% dos casos ($n = 40$), com evolução normalmente benigna (houve um óbito decorrente de pancreatite).

O pâncreas exócrino tem uma considerável reserva funcional, de forma que apenas os distúrbios que afetam porções significativas desse órgão podem causar má digestão, caracterizando a insuficiência do pâncreas exócrino (MACLACHLAN; CULLEN, 1998). No presente estudo, nenhuma alteração histopatológica evidente no pâncreas foi observada nos animais expostos, de forma que os aumentos transitórios da amilase após 24 horas podem ter se dado em resposta a estimulação colinérgica (MORITZ et al., 1994; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000).

Há relatos da ocorrência de pancreatite tóxica associada com a intoxicação aguda pelo aldicarb e outros anticolinesterásicos, fazendo com que a dosagem das enzimas pancreáticas seja importante nestes casos (MORITZ et al., 1994; ROSATI, 1995; CALDAS, 2000; RAGOUCY-SEGLER et al., 2000). Dados em cães sugerem que a diminuição da atividade da colinesterase é diretamente relacionada ao aumento da pressão ductal pancreática e pode ser um fator envolvido na patogênese da pancreatite (MORAES, 1999).

Diversos relatos de intoxicações por organofosforados e desenvolvimento de pancreatite também já foram também relatados (HUI, 1983; DIVE et al, 1994; WEIZMAN; SOFER, 1992), acompanhados de severa hiperglicemia e acidose metabólica, e muitas vezes, sem a presença de alterações macro- e microscópicas no pâncreas.

Para avaliar uma possível lesão muscular cardíaca, no presente estudo, foi mensurada a CK-Mb, que não foi alterada em nenhum dos grupos expostos ao aldicarb, sugerindo não ter participação relevante no quadro de intoxicação em camundongos.

As substâncias tóxicas mais letais são aquelas que produzem danos ao fígado, rins, coração, cérebro e medula óssea. Embora algumas delas produzam lesões

específicas, a maioria dos agentes tóxicos promove efeitos generalizados no animal e lesões por patogenias complexas (CHEVILLE, 1994).

A lesão celular, durante processos de hipóxia e diminuição da fosforilação oxidativa, promove diversas alterações bioquímicas e desequilíbrios na manutenção da integridade celular. A desestruturação celular, com alterações na permeabilidade da membrana, induz a liberação de fosfolipases, ativação de enzimas lisossômicas e liberação de radicais livres, podendo evoluir para lesão irreversível e morte celular (COLLICCHIO ZUANAZE, 2006). Tal evolução depende, entretanto, da dose, do fluxo sanguíneo e dos padrões enzimáticos do tecido envolvido (CHEVILLE, 1994).

A apoptose é um fenômeno sabidamente importante na indução da morte celular sob o ponto de vista da Toxicologia (ALISON; SARRAF, 1995; RAFFRAY; COHEN, 1997). De fato, é reconhecido que a apoptose pode ser a principal forma de indução química da morte celular e antecede a ocorrência da necrose, sendo que esta última ocorre mais freqüentemente quando há lesão celular generalizada (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003). A apoptose também pode ser induzida por várias formas de estresses e danos ao DNA (YOON et al., 2001).

A fosfatidilserina (FS) é um lipídeo localizado na face interna da membrana celular. A anexina V, utilizada no presente trabalho como marcadora das células em apoptose, é uma proteína que se liga preferencialmente a alguns fosfolipídeos, como a FS, e mostra baixa afinidade a outros tipos de fosfolipídeos, como a fosfatidilcolina e a esfingomiélin, os quais são constituintes das camadas externas das membranas plasmáticas (VERMES et al., 1995).

Quando se iniciam os estágios iniciais da apoptose, a FS é translocada para a face externa da membrana celular, ligando-se à substância marcadora anexina (fluorescência verde), que pode ser analisada pelo citômetro de fluxo. Da mesma forma, a diferenciação com as células em necrose, pode ser realizada com a utilização do iodeto de propídeo (fluorescência vermelha), um marcador que penetra pelas membranas que perderam a integridade, como a das células necróticas e daquelas células nos estágios finais da apoptose. No presente trabalho, a utilização deste procedimento conjugado, mostrou-se bastante útil na avaliação das citotoxicidade de leucócitos e de hepatócitos expostos ao aldicarb.

No caso do fígado, tem sido descrito o papel da apoptose na toxicidade de xenobióticos e metabólitos gerados na biotransformação (FELDMANN, 1997; GÓMEZ-LECHÓN et al., 2001). Neste processo de morte celular, tem sido

demonstrado que a mitocôndria exerce papel importante, já que após a eliminação de algumas de suas proteínas no citoplasma, os eventos apoptóticos tornam-se irreversíveis. Tal eliminação se dá pela transição da permeabilidade mitocondrial, sendo esta alteração colocada como sendo um dos principais mecanismos de indução da morte celular por necrose e apoptose, (PESSAYRE et al., 1999; GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003). Somam-se a esta alteração, outros mecanismos envolvendo a ação do estresse oxidativo, a fragmentação do DNA e a ativação da cascata de caspases (NISHIMURA et al., 2006).

No presente trabalho (experimento 11) avaliou-se a apoptose hepática *in vivo*, buscando saber se a degeneração celular observada principalmente 24 e 48 horas após a exposição ao aldicarb poderia culminar com a morte das células, visto que não foi observada a ocorrência de necrose evidente neste tecido. Para tanto, foi escolhido o método desenvolvido por Stinchcombe et al. (1995) que permite a identificação e quantificação dos corpúsculos hepáticos por meio da fluorescência. Este método é baseado na característica desses corpúsculos de se apresentarem fortemente eosinofílicos à microscopia de luz e emitirem fluorescência em lâminas coradas pela hematoxilina eosina. Essa capacidade de emissão fluorescência, portanto, é dada pela eosina ao corar os componentes e estruturas celulares eosinofílicas. Os corpúsculos podem estar acompanhados de outros pequenos corpúsculos, de diferentes formatos e intensidade de fluorescência, que representam o resultado da fragmentação ou degradação da célula apoptótica.

Por esta avaliação se observa que os corpúsculos que não possuem cromatina mostram maior fluorescência do que aqueles contendo cromatina, provavelmente pela baixa condensação de estruturas eosinofílicas. A desvantagem deste método é que apenas possibilita a identificação dos estágios finais da apoptose, enquanto os estágios iniciais deste processo, caracterizados pela condensação da cromatina, são negligenciados por este método. Entretanto, estes estágios ocorrem muito rapidamente *in vivo*, de forma que a contagem destas células não interfere na quantificação real dos corpúsculos apoptóticos.

No experimento 11, foi possível mostrar que os camundongos expostos ao aldicarb apresentavam maior número corpúsculos apoptóticos hepáticos, em relação aos animais não expostos, sendo este aumento considerado significativo para os animais do grupo 24 horas em relação ao grupo controle.

A apoptose hepática tem sido descrita em condições fisiológicas, patológicas e experimentais (PAGLIARA et al., 2003). De fato, diversos medicamentos com ação no fígado e agentes tóxicos são capazes de induzir a apoptose de hepatócitos (FELDMANN, 1997), tais como vimblastina, lidocaína, tetracloreto de carbono, microcistinas, nitrato de chumbo, álcool, dimetilnitrosamina, cocaína, antiinflamatórios não esteroidais, zineb, maneb, dietilditiocarbamato, aflatoxina, cobre e outros (BURSCH; OBERHAMMER; SCHULTE-HERMANN, 1992; CASCALES et al., 1994; FELDMANN, 1997; MCDERMOTT et al., 1998; GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003; PAGLIARA et al., 2003; KIMOTO-KINOSHITA; NISHIDA; TOMURA, 2004; NISHIMURA et al., 2006; JIA; MISRA, 2007). A apoptose de hepatócitos tende a ser observada nas regiões próximas a veia centro lobular (zona 3), mas pode ocorrer também em todas as zonas do lóbulos hepático (FELDMANN, 1997).

A avaliação *in vitro* da exposição de hepatócitos ao aldicarb (Experimento 13) foi realizada de forma semelhante aos ensaios realizados com leucócitos; porém, foram utilizadas concentrações de 50, 5 e 0,5 μM e o período de incubação foi de 24 horas. Os resultados também mostram que tanto o aldicarb técnico como o contido em uma formulação comercial são capazes de induzir apoptose em uma porcentagem hepatócitos superior ao do grupo controle, em todas as concentrações avaliadas, sendo considerada significativa nas concentrações de 50 e 0,5 M do padrão técnico e de 50 e 5 μM do produto formulado (Temik[®]).

Na avaliação dos hepatócitos em apoptose final e/ou em necrose, a maior porcentagem de ocorrência ($p < 0,05$) foi observada nas células expostas às menores concentrações do aldicarb técnico e do produto comercial, remetendo os achados de Olson (1987) em linfócitos, que observou resultados significantes nas menores concentrações avaliadas. Por outro lado, o produto comercial induziu maior aparecimento de células com estas características, sugerindo que o(s) excipientes(s) utilizado(s) na formulação podem exercer alguma influência na indução da apoptose, já que não houve diferença na porcentagem de células necróticas expostas ou não expostas.

Vale ressaltar ainda que alterações no material genético e indução de apoptose/necrose por praguicidas foram estudadas também em outras células. Organofosforados (OF), carbamatos (CARB), piretróides (PIR) e organoclorados (OC) já foram citados como indutores de alterações no DNA e apoptose/necrose em neuroblastoma humano (OF e CARB) e linfócitos (OF, CARB, PIR e OC) (CARLSON;

JORTNER; EHRICH, 2000; YOON et al., 2001; JIA; MISRA, 2007). Da mesma forma, estudos *in vitro* com outro carbamato altamente tóxico, o carbofurano, mostraram que um de seus metabólicos, o n-nitrosocarbofuran, induz a apoptose de fibroblastos pulmonares de hamster, promovendo alterações morfológicas celulares, fragmentação de DNA e ativação de caspases (YOON et al., 2001). Tais estudos despertam para a possível relação entre a ocorrência de diversos distúrbios, como os de natureza imunológica, genotóxica e degenerativa, e a exposição aos praguicidas (SOLONESKI et al., 2001; UNDEGER; BASARAN, 2004; CALVIELLO et al., 2006; JIA; MISRA, 2007).

6.3 Considerações consolidadas sobre a exposição ao aldicarb

A intoxicação exógena aguda por praguicidas carbamatos e organofosforados tem sido um problema freqüente tanto na rotina das clínicas e hospitais veterinários, como nos serviços de emergência dos grandes hospitais humanos, seja por ingestão acidental ou intencional. Neste contexto, destaca-se o aldicarb, um praguicida carbamato de extrema toxicidade que, a despeito de seu uso ter sido restrito a algumas culturas agrícolas no Brasil, foi transformado em agente de uso ilícito como rodenticida doméstico ou para propósitos criminosos diversos, incluindo a morte de animais e de seres humanos. O produto ilícito, por vezes, contém ainda materiais e contaminantes variados, como pólvora, sementes, talco, raticidas cumarínicos, areia, entre outros (CALDAS, 2000).

A grande participação deste carbamato nas intoxicações em animais fica evidente em diversos trabalhos nacionais e internacionais. Em estudos de casuística brasileiros, em animais de companhia, ele é apontado entre os principais agentes tóxicos e como causa freqüente de óbito em exames anatomopatológicos (SPINOSA; FLÓRIO, 1993; LOBO JR., 2003; GUIMARAES et al., 2005; ALMEIDA et al., 2007; XAVIER et al., 2007). É por este motivo que o estudo das intoxicações por este praguicida é tão importante, tendo em vista também a escassez de trabalhos abordando os seus efeitos agudos e ausência de estudos considerando as conseqüências sistêmicas em animais que sobrevivem à exposição.

A descrição dos sinais clínicos da intoxicação por praguicidas anticolinesterásicos é semelhante entre as diversas espécies animais. A síndrome colinérgica resultante da inibição da acetilcolinesterase e estimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos traz a manifestação de sinais clínicos clássicos, cuja magnitude e severidade dependem da dose, via e frequência de exposição, das propriedades físico-químicas do próprio agente e de componentes da formulação e também da espécie, idade, raça e estado fisiológico do animal envolvido.

Neste contexto, um animal experimentalmente intoxicado difere, em alguns aspectos, daqueles assistidos no cotidiano do atendimento clínico. As diferenças estão na gravidade das manifestações clínicas e na urgência de reversão dos mesmos, nos efeitos nocivos induzidos agudamente e de suas repercussões após a reversão do quadro agudo, bem como no aspecto da terapêutica, já que o uso de medicações inapropriadas pode agravar o prognóstico e levar o animal mais rapidamente à morte.

Considerando os nossos trabalhos com o aldicarb, iniciados com a avaliação da casuística e com o estudo das alterações observadas à necropsia, foi possível compor um quadro caracterizado pela gravidade das exposições, sendo que todas as intoxicações por aldicarb incluídas nos estudos foram o resultado de intoxicações criminosas, quando uma grande quantidade de agente tóxico é misturada a alimentos palatáveis e oferecida ao animal para promover a sua morte.

Neste sentido, observamos alterações severas na avaliação *post mortem*, apesar da sintomatologia evoluir rapidamente para a morte quando nenhuma medida emergencial que impeça a absorção de doses letais do praguicida é realizada. Dados da literatura apontam para a ocorrência da morte cerca de 15 minutos após a ingestão do aldicarb, sendo a morte súbita, muitas vezes, a principal ocorrência contida no histórico dos animais encaminhados para o exame necroscópico. De fato, foi encontrada uma prevalência de 51,8% de morte súbita em cães e gatos expostos ao aldicarb intencionalmente (XAVIER et al., 2007) e, em nossos experimentos, a exposição de camundongos a doses letais (DL₅₀) promoveu a morte em poucos minutos (2,6 – 4,7 minutos), precedida por início rápido dos sinais clássicos da intoxicação (a partir de 1,4 minuto da exposição) e episódios convulsivos fatais.

Sendo assim, parece evidente que o ponto crítico no atendimento às intoxicações pelo aldicarb em cães e gatos é a instituição de medidas emergenciais de descontaminação, destacando-se entre elas a indução da êmese (em pacientes alertas), a

lavagem gástrica (preferencial, pois há proteção das vias aéreas) e a utilização do carvão ativado tão logo quando do atendimento e por no mínimo 48 horas.

Isto porque, apesar de termos verificado a recuperação do quadro agudo nos camundongos em até doze horas e referências que apontam para a eliminação do aldicarb quase que totalmente dentro de 24 horas, deve-se considerar a possibilidade de variação individual, com inibição enzimática mais duradoura e fatores diversos (como a circulação enterohepática) que retardem a sua eliminação (CALDAS, 2000). Oliveira e Menezes (2003) apontam que a reversão dos efeitos dos carbamatos ocorre dentro de 24 a 48 horas, mas há relatos de inibição persistente em seres humanos intoxicados por aldicarb (RAGOUCY-SEGLER et al., 2000). Além disso, há que se considerar a possibilidade de exposição mista com outros praguicidas, como os organofosforados (ANDRADE FILHO; ROMANO, 2001).

Em nossos estudos ficou claro que os órgãos de choque da ação do aldicarb foram os pulmões, o fígado e rins, onde as alterações mais importantes foram observadas. Apesar das alterações serem inespecíficas, o conjunto delas pode sugerir a intoxicação pelo aldicarb, juntamente com os achados de necropsia, e fornecer subsídios para a análise toxicológica e o diagnóstico definitivo.

Podemos sugerir que cães e gatos expostos a doses letais e que não são submetidos ao tratamento emergencial, vêm a óbito por alterações circulatórias graves observadas mormente nos pulmões e que a combinação destas com a estimulação muscarínica e os efeitos cardíacos provavelmente são os responsáveis pela morte dos animais por insuficiência respiratória. Neste sentido, a importância da manutenção das vias aéreas, a atropinização e o monitoramento cardíaco por meio de eletrocardiograma são essenciais, principalmente nas primeiras 24 horas da intoxicação. Lobo Jr. (2003) atentou para a importância deste exame na avaliação de cães intoxicados pelo aldicarb ao identificar a ocorrência de distúrbios no traçado eletrocardiográfico e Caldas (2000) indicou a possibilidade de arritmias cardíacas (fibrilação atrial e ventricular) até 72 horas após a intoxicação por anticolinesterásicos em seres humanos.

Ainda em relação à manutenção das vias aéreas, alguns autores sugerem que a decisão de se repetir a atropina deve basear-se na persistência ou recorrência de sinais respiratórios, como dispnéia e presença de secreções respiratórias, e não apenas na miose e no controle da sialorréia (GFELLER; MESSONNIER, 1998).

Por outro lado, observando as alterações congestivas em diversos órgãos e os efeitos da hipóxia, bem como a possível ação direta do agente tóxico e de seus

metabólitos sobre as células, torna-se importante o controle de parâmetros de patologia clínica, tais como hemograma, função renal, função hepática, glicemia e função pancreática exócrina, pelo menos nas primeiras 48 horas após a exposição, repetindo-se a análise após 7 e 14 dias. Observamos nos experimentos realizados que quatro avaliações são valiosas no acompanhamento da evolução do quadro clínico. Além disso, vale destacar que os nossos estudos foram conduzidos em condições controladas e em animais hígidos, sugerindo que a exposição ao aldicarb por animais com outras doenças intercorrentes (tais como cardiopatias, hepatopatias, endocrinopatias e nefropatias) podem promover a indução de alterações mais evidentes, mais duradouras e graves do que as encontradas em nossos experimentos.

Em relação à função do pâncreas exócrino, encontramos alterações semelhantes às descritas em seres humanos intoxicados pelo aldicarb, havendo registros de óbitos relacionado à pancreatite aguda grave, induzida pelo aldicarb. Sendo assim, reiteramos aqui a importância da avaliação clínica (palpação abdominal e, se necessário, ultrasonografia) e laboratorial (enzimas amilase e lipase) deste órgão, exames provavelmente bastante negligenciados durante o tratamento de animais intoxicados por este carbamato.

Além disso, é importante também a avaliação da glicemia, principalmente nas primeiras 24 horas após a intoxicação, pois notamos aumento deste parâmetro em animais expostos e sabemos ser uma prática comum a utilização de soro glicosado em situações emergenciais.

A despeito do conflito entre os dados disponíveis na literatura e os efeitos imunotóxicos do aldicarb, nossos resultados sugeriram uma possível ação imunossupressiva do aldicarb em doses altas, observada nos estudos *in vivo* e *in vitro*, a qual deve ser levada em consideração durante o atendimento e acompanhamento dos animais expostos. Há que se atentar para a toxicidade sobre a medula óssea e a leucopenia observada nos animais experimentais durante o período de até 7 dias e sua repercussão especialmente em animais imunocomprometidos, em esquema de vacinação e/ou portadores de doenças debilitantes.

Considerando os resultados em conjunto, concluímos que, em animais sobreviventes, o monitoramento feito por meio da avaliação clínica e laboratorial completa, com ênfase nos órgãos e tecidos que se mostraram mais afetados pela exposição ao aldicarb, durante pelo menos 14 dias após a exposição, pode ser útil para

adequar a pronta intervenção do médico veterinário, favorecendo a recuperação do animal.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Estudo das alterações *post mortem* microscópicas dos casos de intoxicação por aldicarb em cães e gatos

- Todos os achados histopatológicos encontrados possuíam natureza circulatória e/ou degenerativa;
- Considerando a espécie canina, as principais alterações microscópicas foram observadas nos pulmões, no fígado e nos rins, destacando-se a congestão (78%), o edema (62%) e a hemorragia (74%) pulmonares; a congestão (72%) e a degeneração vacuolar (46%) hepáticas e a congestão (64%), a hemorragia renal (26%) e a nefrose (26%);
- Na espécie felina, as alterações histopatológicas foram semelhantes às encontradas nos cães, sendo os principais órgãos acometidos também os pulmões, o fígado e os rins. Neste sentido, destacaram-se a congestão (88%), o edema (76%) e a hemorragia (52%) pulmonares; a congestão (86%) e a degeneração vacuolar (46%) hepáticas e a congestão (78%), a hemorragia renal (30%) e a nefrose (14%);
- Alterações circulatórias (congestão e/ou hemorragia) foram também observadas com menores frequências no cérebro, cerebelo, pâncreas, baço, coração e timo de ambas espécies e no intestino, linfonodos e estômago de cães;
- Para ambas espécies, de forma geral, não foi encontrada nenhuma relação entre a toxicidade do agente (intensidade da lesão) e a idade do animal; entretanto, foi observado que no pulmão de cães jovens (até 5 anos) houve o predomínio de alterações severas e, de forma significativa, para ambas espécies, os animais idosos apresentaram o maior grau de degeneração vacuolar hepática e que em adultos a congestão renal foi a mais severa.

Intoxicação experimental por aldicarb (Temik®) em camundongos

- Na avaliação do quadro clínico da intoxicação aguda pelo aldicarb em camundongos, foi observado que a exposição oral a doses entre 0,07 mg/kg até 1,0 mg/kg promove o aparecimento dos sinais clássicos da intoxicação por anticolinesterásicos (prostração, tremores e fasciculações, sialorréia), de rápido início (menos de 5 minutos) e duração de até duas horas;
- Doses superiores a 0,08 mg/kg promoveram a rápida morte de todos os animais (em menos de 5 minutos), sendo em todos os casos o óbito precedido de convulsões. A dose de 0,08 mg/kg promoveu baixa letalidade (33%) e alta morbidade (100%), sendo a considerada ideal para a avaliação das alterações clínicas, patológicas e laboratoriais após o quadro agudo (até 14 dias após a exposição);
- Os camundongos expostos ao aldicarb mostraram, de forma geral, maior consumo de água (do 2º até o 5º dia), menor consumo de alimento e menor ganho de peso (significante nas primeiras 48 horas);
- Em relação aos achados de microscopia, achados semelhantes aos observados em cães e gatos foram encontrados, demonstrando que os pulmões, o fígado e os rins são os principais órgãos afetados, sendo as lesões mais frequentes e severas nas primeiras 48 horas após a intoxicação. Foram observados congestão, edema e hemorragia pulmonares apenas após 24 e 48 horas, a congestão renal e hepática até o sétimo dia após a exposição e a degeneração hepática e renal até o 14º dia após a toxicose. Quanto a degeneração hepática, foi observada vacuolização intensa dos hepatócitos, principalmente em zona 3, sendo relacionada a edema celular nas primeiras 24 horas e também a degeneração gordurosa após 48 horas, conforme mostraram os resultados da microscopia eletrônica e da histoquímica;
- Sob o ponto de vista clínico, consideramos importantes as seguintes alterações laboratoriais observadas: leucopenia (até o 7º dia após a exposição); aumento da glicemia e da amilase (nas primeiras 24 horas), aumento dos triglicérides e da creatinina (nas primeiras 48 horas). Neste sentido, recomenda-se o monitoramento do hemograma, da glicemia, da função renal, da função

pancreática exócrina e da função hepática (considerando os achados de microscopia) nos animais intoxicados, por pelo menos 14 dias após a exposição;

- Nos ensaios de imunotoxicologia, destacamos o aumento do peso relativo do timo e da celularidade do baço, bem como a diminuição significativa da celularidade da medula nas primeiras 48 horas após a exposição;
- O aldicarb foi capaz de induzir ao aumento da apoptose hepática nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, bem como na ocorrência de necrose e de apoptose de leucócitos de camundongos *in vitro*.

Todos estes achados demonstram que a exposição oral aguda grave ao aldicarb produz efeitos tóxicos severos, os quais se destacam nos pulmões, fígado, rins, pâncreas e sistema imune, notadamente nas primeiras 48 horas após a intoxicação. Neste sentido, estas alterações devem ser identificadas e/ou monitoradas por meio do exame anatomo-histopatológico nos casos de óbito e pela avaliação clínica e laboratorial completa nos animais sobreviventes, durante pelo menos 14 dias após a exposição.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALISON, M. R.; SARRAF, C. E. Apoptosis: regulation and relevance to toxicology. **Human and Experimental Toxicology**, v. 14, p. 234-247, 1995.
- ALLEN, D. G.; PRINGLE, J. K.; SMITH, D. A. **Handbook of veterinary drugs**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. 886 p.
- ALMEIDA, C. G.; XAVIER, F. G.; FERRANTE, T.; SPINOSA, H. S. Intoxicação em cães e gatos: uma análise de casuística. **Clínica Veterinária**, n. 67, p. 42-46, 2007.
- ALONZO, H. G. A.; CORRÊA, C. L. Praguicidas. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. p. 437-458.
- ANDRADE, S. F.; FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G.; ANDRADE NETO, J. P. Terapêutica do sistema nervoso. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 422-427.
- ANDRADE FILHO, A.; ROMANO, C. Anticolinesterásicos. In: ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, 2001. p. 53-60.
- ANDRAWES, N. R.; DOROUGH, H. W.; LINDQUIST, D. A degradation and elimination of Temik in rats. **Journal of Economic Entomology**, v. 60, p. 979-987, 1967.
- ANTONIOU, V.; ZANTOPOULOS, N.; TSOUKALI, H. Fatal animal poisonings in northern Greece: 1990 – 1995. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 35-36, 1997.
- BARON, R. L. A carbamate insecticide: a case study of aldicarb. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 11, p. 23-27, 1994.
- BLODGETT, D. J. Organophosphate and carbamate insecticides. In: PETERSON, M. E.; TALCOTT, P. A. **Small animal toxicology**. 2. ed. St. Louis: Saunders, 2006. p. 941-955.

BOYD, C. A.; WEILER, M. H.; PORTER, W. P. Behavioral and neurochemical changes associated with chronic exposure to low-level concentration of pesticides mixtures. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 30, p. 209-221, 1990.

BURNS, L. A.; MEADE, B. J.; MUNSON, A. E. Toxic responses of the immune system. **Casarett and Doull's. Toxicology: the basic science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 355-402.

BURSCH, W.; OBERHAMMER, F.; SCHULTE-HERMANN, R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 245-251, 1992.

BURSCH, W.; PAFFE, S.; PUTZ, B.; BARTHEL, G.; SCHULTE-HERMANN, R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and altered hepatic foci of rats. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 847-853, 1990.

BURGESS, J. L.; BERNSTEIN, J. N.; HURLBUT, K. Aldicarb poisoning. A case report with prolonged cholinesterase inhibition and improvement after pralidoxime therapy. **Archives of Internal Medicine**, v. 154, n. 24, p. 221-224, 1994.

CALDAS, L. Q. A. **Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides**. Niterói: Centro de Controle de Intoxicações do Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense, 2000. 40 p.

CALDAS, L. Q. A.; UNES, A. F. Forbidden rodenticide in Brazil leading to increasing death rate by poisoning. **Toxicology Letters**, v. 95, p. 142, 1998. Supplement.

CALFI, M.; GENNARI, A.; MALERBA, I.; CORSINI, E.; PALLARDY, M.; PIETERS, H.; VAN LOVEREN, H.; VOHR, H. W.; HARTUNG, T.; GRIBALDO, L. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. **Toxicology**, v. 229, p. 11-22, 2007.

CALVIELLO, G.; PICCIONI, E.; BONINSEGNA, A.; TEDESCO, B.; MAGGIANO, N.; SERINI, S.; WOLF, F. I.; PALOZZA, P. DNA damage and apoptosis induction by Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, p. 87-96, 2006.

CALZETTA, L.; CAVALIERE, M.; RUGGERI, E.; RICCI, A.; CRESCENZO, G.; AMORENA, M. Incidence of intentional poisoning of dogs in the Abruzzo region of Italy. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 111-113, 2002.

CAMBON, C.; DECLUME, C.; DERACHE, R. Effect of the insecticidal carbamate derivatives (carbofuran, pirimicarb, aldicarb) in the activity of acetylcholinesterase in tissues from pregnant rats and fetuses. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 49, p. 203-208, 1979.

CAMPBELL, T. W. Hematologia de mamíferos: animais de laboratório e espécies variadas. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D. FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A. WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 201-214

CARLSON, K.; JORTNER, B. S.; EHRICH, M. Organophosphorous compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 168, p. 102-113, 2000.

CARLSON, T. L. Envenenamentos por inseticidas organofosforados e a base de carbamatos. In: KIRK, R. W. **Atualização terapêutica veterinária IX: pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1988. v. 1, p. 192-195.

CASCALES, M.; ALVAREZ, A.; GASCO, P.; FERNANDEZ-SIMON, L.; SANZ, N.; BOSCA, L. Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. **Hepatology**, v. 20, p. 992-1001, 1994.

CAZENAVE, S. O. S.; ITHO, S. F.; LANARO, R.; CHASIN, A. A. M. Aldicarb: uma possibilidade de análise com finalidade forense. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 2, p. 105-111, 2005.

CHEVILLE, N. F. **Introdução à patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1994. 556 p.

COBB, G. P.; HARPER, F. D.; WEISSKOPF, C. P. Nonlethal method for forensic evaluation of aldicarb exposure in wildlife. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 77-88, 2001.

COLLICCHIO ZUANAZE, R. C. **Perfil hematológico, bioquímico, histopatológico e toxicológico de gatos induzidos experimentalmente com monofluoroacetato de sódio**. 2006. 167 p.Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

COMPÊNDIO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS. 2008. Disponível em:
<<http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/index.html>>. Acesso em: 28 jan. 2008.

CONFER, A. W.; PANCIERA, R. J. Sistema urinário. IN: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. p. 228-265.

CRESPILHO, D. M.; PAULI, J. R.; LEITE, J. A. C. A.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico sobre aspectos metabólicos e imunológicos em ratos administrados com dexametasona. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 2, p. 109-118, 2006.

DEAN, T. N.; KAKKANAIHAH, V. N.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Immunosuppression by aldicarb of I cell responses to antigen-specific and polyclonal stimuli results from defective IL-1 production by the macrophages. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 106, p. 408-417, 1990a.

DEAN, T. N.; SELVAN, R. S.; MISRA, H. P.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Aldicarb treatment inhibits the stimulatory activity of macrophages without affecting the T-cell responses in the syngeneic mixed lymphocyte reaction. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 337-348, 1990b.

DELAUNOIS, A.; LESSIRE, F.; FANAL, H.; ANSAY, M.; BLODEN, S.; GUSTIN, P. Temik poisonings in domestic and wild animals: an alarming problem in wallony. **Annales de Medecine Veterinaire**, v. 141, n. 5, p. 353-360, 1997.

DIVE, A.; MAHIEU, P.; VAN BINST, R.; HASSOUN, A.; LISON, D.; DE BISSCHOP, H.; NEMERY, B.; LAUWERYS, R. Unusual manifestations after malathion poisoning. **Human and Experimental Toxicology**, v. 13, p. 271-274, 1994.

DORMAN, D. C.; HARLIN, K. A.; HASCHEK, W. M.; ROSS, S. S.; WISSE, C. A.; MEERDINK, G. L. Aldicarb toxicosis in a flock of sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 45-47, 1992.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOUL, J. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 643-690.

FABRIS, V. E. Lesões celulares reversíveis ou irreversíveis. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 41-80.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, p. 479-517, 2005.

FARLEY, T. A.; MCFARLAND, L. M. Aldicarb as a cause of food poisoning – Louisiana, 1998. **Journal of the American Medical Association**, v. 281, n. 21, p. 1979-1980, 1999.

FELDMANN, G. Liver apoptosis. **Journal of Hepatology**, v. 26, n. 2, p. 1-11, 1997.

FERREIRA, M. C. L.; BARBOSA, G. M.; ROSATI, J. L. R. Intoxicação exógena como causa de hiperglicemia. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v. 66, n. 6, p. 509-510, 1992.

FIOCRUZ. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas (SINITOX)**. 2008. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br>>. Acesso em: 12 jan. 2008.

FISHEL, F. M. **Pesticide toxicity profile: carbamate pesticides**. Pesticide Information. Florida: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2005. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 09 out. 2006.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. H. **Epidemiologia clínica: aspectos essenciais**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 130 p.

FOCK, R. A. **Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação dos receptores de LPS (CD14/TLR-4) e do fator de transcrição NFκB**. 2005. 132 p. Tese (Doutorado). 132p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FRAZIER, K.; HULLINGER, G.; HINES, M.; LIGGETT, A.; SANGSTER, L. 162 cases of aldicarb intoxication in Georgia domestic animals from 1988-1998. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 41, n. 4, p. 233-235, 1999.

GAD, S. C.; WEIL, C. S. Statistics for toxicologists. In: HAYES, A. W. (Ed.). **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p. 435-483.

GARBER, M. Carbamate poisoning: the "other" insecticide. **Pediatrics**, v. 79, n. 5, p. 734-737, 1987.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela. 2005. 206 p.

GFELLER, R. W.; MESSONNIER, S. P. Acute organophosphate and organocarbamate poisoning. In: _____. **Small animal toxicology and poisonings**. St. Louis: Mosby, 1998. p. 73-76.

GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw Hill, 1996. 1905 p.

GOLDMAN, L. R. Case studies of environmental risks to children. **The Future of Children**, v. 5, n. 2, p. 27-33, 1995.

GOLDMAN, L. R.; BELLER, M.; JACKSON, R. J. Aldicarb food poisonings in California, 1985-1988: toxicity estimates for humans. **Archives of Environmental Health**, v. 45, n. 3, p. 141-147, 1990.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; O'CONNOR, E.; CASTELL, J. V.; JOVER, R. Sensitive markers identifying toxic compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. **Toxicological Sciences**, v. 65, p. 299-308, 2001.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; PONSODA, X.; O'CONNOR, E.; DONATO, T.; JOVER, R.; CASTELL, J. V. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 675-680, 2003.

GONÇALVES, E. A. P.; DALBONI, M. A.; PERES, A. T.; MANFREDI, A. P.; MANFREDI, S. R.; AZEVEDO, S. M.; MAGALHAES, F.; DRAIBE, S.; CANZIANI, M. E. F.; CENDOROGLO, M. Effect of microcystin on leukocyte viability and function. **Toxicon**, v. 47, p. 774-779, 2006.

GRENDON, J.; FROST, F.; BAUM, L. Chronic health effects among sheep and humans surviving an aldicarb poisoning incident. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 36, n. 3, p. 218-223, 1997.

GUIMARAES, P.T.C.; MELO, M. M.; VEADO, J. C. C.; OLIVEIRA, J.; MELO, M. B. Pesquisa de aldicarb no soro, urina, dialisato e hemoperfusor de cães intoxicados experimentalmente com aldicarb e submetidos a hemodiálise e hemoperfusão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 7, n. 2, p. 26, 2005.

GUIART, R.; MANOSA, S.; GUERRERO, X.; MATEO, R. Animal poisonings: the 10-year experience of a veterinary analytical toxicology laboratory. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 41, n. 5, p. 331-335, 1999.

HANSEN, S. R. Management of organophosphate and carbamate toxicoses. In: BONAGURA, J. D.; KIRK, R. W. **Current veterinary therapy**, 12. ed. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 245-248.

HARPER, F. D.; WEISSKOPF, C. P.; COBB, G. P. Extraction of aldicarb and its metabolites from excreta and gastrointestinal tissue. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 3329-3332, 1998.

HE, F.; XU, H.; QIN, F.; XU, L.; HUANG, J.; HE, X. Intermediate myasthenia syndrome following acute organophosphates poisoning – an analysis of 21 cases. **Human and Experimental Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 40-45, 1998.

HENRIQUE, B. S. **Efeitos tóxicos da *Ipomoea carnea* em caprinos. II – Estudos de teratogenicidade**. 2005. 156 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HODGSON, E. H.; MAILMAN, R. B.; CHAMBERS, J. E.; DOW, R. E. **Dictionary of toxicology**. 2. ed. London: Macmillan, 2000. 504 p.

HONG, R. Effects of environmental toxins on lymphocyte function: studies in rhesus and man. **Annals of Allergy**, v. 66, n. 6, p. 474-480, 1991.

HORNFELDT, C. S.; MURPHY, M. J. Poisonings in animals: a 1990 report of the American Association of Poison Control Centers. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 248-250, 1992.

HUEZA, I. M. **Parâmetros inflamatórios, imunológicos e histopatológicos da administração prolongada da *Ipomoea carnea* em ratos: 1. Avaliação em animais adultos 2. Estudo perinatal**. 2006. 329 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

HUI, K. S. Metabolic Disturbances in Organophosphate Insecticide Poisoning. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 107, p. 154, 1983.

IRWIN, S. Comprehensive observational assessment I: a systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiological state of the mouse. **Psychopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 222-257, 1968.

JIA, Z.; MISRA, H. P. Exposure to mixtures of endosulfan and zineb induces apoptotic and necrotic cell death in SH-SY5Y neuroblastomancells, in vitro. **Journal of Applied Toxicology**, v. 27, n. 5, p. 434-446, 2007.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole, 2000. 1415 p.

JOHNSON, M. K. Symposium introduction: retrospect and prospects for neuropathy target esterase (NTE) and the delayed polineuropathy (OPIDP) induced by some organophosphorus esters. **Chemico-biological Interactions**, v. 87, p. 339-346, 1993.

KALKAN, S.; ERDOGAN, A.; AYGOREN, O.; CAPAR, S.; TUNCOK, Y. Pesticide poisonings reported to the Drug and Poison Information Center in Izmir, Turkey. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 50-52, 2003.

KERR, L. A.; PRINGLE, J. K.; ROHRBACH, B. W.; EDWARDS, W. C.; OFFUTT, J. E. Aldicarb toxicosis in a dairy herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 9, p. 1636-1639, 1991.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KIMOTO-KINOSHITA, S.; NISHIDA, S.; TOMURA, T. T. Diethyldithiocarbamate can induce two different type of death: apoptosis and necrosis mediating the differential MAP kinase activation and redox regulation in HL60 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 265, p. 123-132, 2004.

KNAAK, J. B.; TALLANT, M. J.; SULLIVAN, L. J. The metabolism of 2-methyl-2-(methylthio) propionaldehyde O-(methyl-carbamoyl) oxime in the rat. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 14, p. 573-578, 1966.

KERR, L. A.; PRINGLE, J. K.; ROHRBACH, B. W.; EDWARDS, W. C.; OFFUTT, J. E. Aldicarb toxicosis in a dairy herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 9, p. 1636-1639, 1991.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial do fígado. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A. WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 335-354.

LASSEN, E. D.; FETTMAN, M. J. Avaliação laboratorial dos lipídeos. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A. WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 394-402.

LASSEN, E. D.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em medicina veterinária. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A. WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 3-36.

LEE, M. H.; RANSDALL, J. F. A farmworker death due to pesticides toxicity: A case report. **J. Toxicology and Environmental Health**, v. 14, p. 239-246, 1984.

LEON, S. F. E.; PADILLA, A. G.; GAMBO, A. N.; VESGA, E. Multiple systemic organ failure, intermediate syndrome, congenital myasthenic syndrome and anticholinesterase treatment: the linkage is puzzling. **Clinical Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 245-246, 1996.

LIFSHITZ, M.; ROTENBERG, M.; SOFER, S.; TAMIRI, T.; SHAHAK, E.; ALMOG, S. Carbamate poisoning and oxime treatment in children: a clinical and laboratory study. **Pediatrics**, v. 93, n. 4, p. 652-655, 1994.

LIMA, J. S.; REIS, C. A. G. Poisoning due to illegal use of carbamates as a rodenticide in Rio de Janeiro. **Clinical Toxicology**, v. 33, n. 6, p. 687-690, 1995.

LOBO JR., J. E. S. **Possível intoxicação pelo “chumbinho” (aldicarb) em cães e gatos atendidos em uma clínica veterinária da grande São Paulo: ocorrência da síndrome intermediária**. 2003. 68 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

LÓPEZ, A. Sistema respiratório. IN: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. p. 132-193.

LORA, J.; ALONSO, F.J.; SEGURA, J.A.; LOBO, C.; MARQUEZ, J.; MATES, J. M. Antisense glutaminase inhibition decreases glutathione antioxidant capacity and increases apoptosis in Ehrlich ascitic tumour cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 4298-4306, 2004.

MACLACHLAN, N. J.; CULLEN, J. M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. P. 95-131.

MANIATIS, N. A.; ORFANOS, S. E. The endothelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Current Opinion in Critical Care**, v. 14, n. 1, p. 22-30, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2008. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários (AGROFIT)**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 11 fev. 2008.

MARRS, T. C.; DEWHURST, I. Toxicology of pesticides. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T.; SYVERSEN, T. **General and applied toxicology**. 2. ed. London: Macmillan, 1999. v. 3, p. 1993-2012.

MARTÍNEZ-HARO, M.; MATEO, R.; GUITART, R.; SOLER-RODRIGUEZ, F.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; MARRÍA-MOJICA, GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J. Relationship of the toxicity of pesticide formulations and their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 396-402, 2007 .

MCDERMOTT, C. M.; NHO, C. W.; HOWARD, W.; HOLTON, B. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. **Toxicon**, v. 36, p. 1981-1996, 1998.

MCENTEE, K.; PONCELET, L.; CLERCX, C.; HENROTEAUX, M. Acute polymyopathy after carbamate poisoning in a dog. **Veterinary Record**, v. 135. p. 88-90, 1994.

MELITO, A. L. **Metodologia para identificação cromatográfica de aldicarb em sangue de cães e gatos intoxicados**. 2004. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MENDES, C. A.; MENDES, G. E.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Acute intoxication due to ingestion of vegetables contaminated with aldicarb. **Clinical Toxicology**, v. 43, n. 2, 2005. p. 117-118.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308 p.

MOHAMED, O. S. A.; ADAM, S. E. I. The effects of Temik and Sumicidin and their mixture on nubian goats. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 464-467, 1990.

MONTESISSA, C.; HUVENEERS, M. B.; HOOGENBOOM, L. A. P.; AMORENA, M.; DE LIGUORO, M.; LUCISANO, A. The oxidative metabolism of aldicarb in pigs: in vivo- in vitro comparison. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 11, n. 2, p. 127-138, 1994.

MORAES, A. N. C. **Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do “chumbinho” no Rio de Janeiro**. 1999. 111 p. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1999.

MOREIRA, C. Q. **Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica**. 2007. 155 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MORGULIS, M. S. F. A.; OLIVEIRA, G. H.; DAGLI, M. L. Z.; PALERMO-NETO, J. Acute 2,4-dichlorophenoxyacetic acid intoxication in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 77, p. 509-515, 1998.

MORITZ, F.; DROY, J. M.; DUTHEIL, G.; MELKI, J.; BONMARCHAND, G.; LEROY, J. Acute pancreatitis after carbamate insecticide intoxication. **Intensive Care Medicine**, v. 20, p. 49-50, 1994.

MOSER, V. C. Comparison of aldicarb and methamidophos neurotoxicity at different ages in the rat: behavioral and biochemical parameters. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 157, p. 94-106, 1999.

MOTAS-GUZMÁN, M.; MARIA-MOJICA, P.; ROMERO, D.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, J. Intentional poisoning of animals in Southeastern Spain. A review of the veterinary toxicology service from Murcia, Spain. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 47-52, 2003.

MOTOYAMA, A. A. **Estudo qualitativo histoenzimológico e ultra-estrutural dos componentes capilares e inervação motora das fibras musculares intrínsecas do terço anterior da língua de ratos Albino Wistar**. 2004. 120 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MYERS, R. K.; MCGAVIN, M. D. Cellular and tissue responses to injury. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4. ed. St Louis: Mosby Elsevier, 2007. 3-62 p.

NETTO, M. B.; SANTOS, J. L.; MONTENEGRO, M. R. Perturbações circulatórias. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 95-108.

NORSWORTHY, G. D. Toxicose por organofosforados e carbamatos. In: NORSWORTHY, G. D.; CRYSTAL, M. A.; GRACE, S. F.; TILLEY, L. P. **O paciente felino**. Tópicos essenciais de diagnóstico e tratamento. 2. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 440-443.

NISHIMURA, Y.; KANADA, A.; YAMAGUCHI, J.; HORIMOTO, K.; KOBAYASHI, M.; TATSUISHI, T.; KANEMARU, K.; UENO, S.; OYAMA, Y. Cytometric analysis of lidocaine-induced cytotoxicity: a model experiment using rat thymocytes. **Toxicology**, v. 218, p. 48-57, 2006.

OGA, S. Toxicocinética. In: _____. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 9-25.

OLIVEIRA, R. D. R.; MENEZES, J. B. Intoxicações exógenas em clínica médica. Urgências e emergências dermatológicas e toxicológicas. **Medicina**, v. 36, p. 472-479, 2003.

OLSON, K. R. **Choque e hipotensão**. IPCSINTOX Databank. 1999. Disponível em: <http://www.intox.org/databank/documents/treat/treatp/trt24_p.htm> Acesso em: 11 fev. 2008.

OLSON, L. J. Aldicarb immunomodulation in mice: an inverse dose-response to parts per billion levels in drinking water. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 16, p. 433-439, 1987.

OSWEILER, G. D. Fatores que influenciam a toxicidade. In: _____. **Toxicologia veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. p. 40-49.

OZBAY, G.; BARLAS, N.; KOLANKAYA, D. Histopathological effects of the residual maneb and zineb in the lettuces on the liver and kidney of albino mice. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, v. 4, n. 4, p. 336-339, 1991.

PAGLIARA, P.; CARLA, E. C.; CAFORIO, S.; CHIONNA, A.; MASSA, S.; ABBRO, L.; DINI, L. Kupffer cells promote lead nitrate-induced hepatocyte apoptosis via oxidative stress. **Comparative Hepatology**, v. 2, n. 8, 2003. Disponível em: <<http://www.comparative-hepathology.com/content/2/1/8>>. Acesso em: 10 fev. 2007.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PELEKIS, M.; KRISHNAN, K. Determination of the rate of aldicarb sulfoxidation in rat liver, kidney and lung microsomes. **Xenobiotica**, v. 25, n. 11, p. 1113-1120, 1997.

PEREIRA, F. E. L. Integração da fisiologia e patologia celulares. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 25-40.

PERKINS, E. J.; EL-ALFY, A.; SCHLENK, D. In vitro sulfoxidation of aldicarb by hepatic microsomes of channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. **Toxicological Sciences**, v. 48, p. 67-73, 1999.

PESSAYRE, D.; MANSOURI, S.; HAOUZI, A.; FROMENTY, B. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. **Cell Biology and Toxicology**, v. 15, p. 367-373, 1999.

PROENÇA, P.; TEIXEIRA, H.; MENDONÇA, M. C.; CASTANHEIRA, F.; MARQUES, E. P.; CORTE-REAL, F.; VIEIRA, D. N. Aldicarb poisoning: one case report. **Forensic Science International**, v. 146S, p. S79-S81, 2004.

RAFFRAY, M.; COHEN, G. M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 75, p. 153-177, 1997.

RAGOUCY-SEGLER, C.; TRACQUI, A.; CHAVONNET, A.; DAIJARDIN, J. B.; SIMONETTI, M.; KINTZ, P.; PILEIRE, B. Aldicarb poisoning. **Human and Experimental Toxicology**, v. 19, p. 657-662, 2000.

ROSATI, J. R. R. Intoxicação por carbamatos e organofosforados. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 69, n. 3, p. 73-98, 1995.

SELVAN, R. S.; DEAN, T. N.; MISRA, H. P.; NAGARKATTI, P. S.; NAGARKATTI, M. Aldicarb suppresses macrophage but not natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity of tumor cells. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, p. 676-682, 1989.

SHARE, D.; RADIC, B.; LUCIÉ, A.; PERAICA, M.; DOMIJAN, A. M.; MILKOVIC-KRAUS, S.; BRADAMANTE, V.; JUKIÉ, I. Adamantyl tenocyclidines – adjuvant therapy in poisoning with organophosphorus compounds and carbamates. **Archives of Toxicology**, v. 76, p. 173-177, 2002.

SHIRAZI, M.; A.; ERICKSON, B. J.; HINS DILL, R. D.; WYMAN, J. A. An analysis of risk from exposure to aldicarb using immune response of nonuniform populations of mice. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 447-456, 1990.

SMITH, R. P. Toxic responses of the blood. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's. Toxicology: the basic science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 335-354.

SOLONESKI, S.; GONZALEZ, M.; PIAGGIO, E.; APEZTEGUIA, M.; REIGOSA, M. A.; LARRAMENDY, M. L. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed *in vitro*. **Mutagenesis**, v. 16, n. 6, p. 487-493, 2001.

SPINOSA, H. S.; FLORIO, J. C. Poisonings in animals: case-reports of the LADTOX (Laboratory of Toxicology Diagnosis) during 1989-1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 1, p. 69, 1993.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 897 p.

SREBOCAN, E.; HRLEC, G.; GRABAREVIC, Z.; POMPE-GOTAL, J.; SABOCANEC, R. Poisoning with acetylcholinesterase inhibitors in dogs: two case reports. **Veterinary Medicine Czech**, v. 6, p. 175-176, 2003.

STINCHCOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCK, K. W.; SCHWARZ, M. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumor promotion in rat liver. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 6, p. 1271-1275, 1995.

SVOBODA, M.; LUSKOVA, V.; DRASTICHOVA, J.; ILABEK, V. The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 70, p. 457-465, 2001.

TALCOTT, P. A.; DORMAN, D. C. Pesticide exposure in companion animals. **Veterinary Medicine**, v. 92, n. 2, p. 167-181, 1997.

THOMAS, P.; RATAJCZAK, H. Assessment of carbamate pesticide immunotoxicity. **Toxicology and Industrial health**, v. 4, n. 3, p. 381-390, 1988.

THOMAS, P.; RATAJCZAK, H.; DEMETRAL, D.; HAGEN, K.; BARON, R. Aldicarb Immunotoxicity: Functional Analysis of Cell-Mediated Immunity and Quantitation of Lymphocyte Subpopulations. **Toxicological Sciences**, v. 15, p. 221-230, 1990.

THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 412 p.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; JAIN, N. Avaliação laboratorial da medula óssea. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 141-169.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. 331 p.

TRACQUI, A.; FLESCHE, F.; SAUDER, P.; RAUL, J. S.; GÉRAUT, A.; LUDES, B.; JAEGER, A. Repeated measurements organofosforados aldicarb in blood and urine in a case organofosforados nonfatal poisoning. **Human & Experimental Toxicology**, v. 20, p. 657-660, 2001.

TUCCI, E. C. Ectoparasitoides. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: Roca, 2005. p. 221.

UNDEGER, U.; BASARAN, N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. **Archives of Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 169-176, 2004.

VAILATI, M. C. F. **Alterações histológicas do miocárdio, rim e fígado de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar submetidos à infusão de angiotensina II. Influência na função ventricular esquerda e resposta ao tratamento com losartan e carvedilol**. 2001. 110 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

VAUX, D. L. Apoptosis and toxicology – what relevance? **Toxicology**, v. 181-182, p. 3-1, 2002.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELLINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VERSTER, R. S.; BOTHA, C. J.; NAIDOO, V. VAN SCHALKWYK, O. L. Aldicarb poisoning of dogs and cats in Gauteng during 2003. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 75, p. 177-181, 2004.

VIDAIR, C. A. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, p. 287 – 302, 2004.

WANG, Y.; KRUIK, P.; HELSBERG, A.; HELSBERG, I.; RAUSCH, W. Pesticide poisoning in domestic animals and livestock in Austria: a 6 year retrospective study. **Forensic Science International**, v. 169, p. 157-160, 2007.

WEIZMAN, Z.; SOFER, S. Acute pancreatitis in children with anticholinesterase insecticide intoxication. **Pediatrics**, v. 90, n. 2, p. 204-206, 1992.

WEXLER, P. Aldicarb. In: _____. **Encyclopedia of toxicology**. San Diego: Academic Press, 1998. v. 1, p. 38-39.

XAVIER, F. G. **Intoxicação por aldicarb (“chumbinho”) em cães e gatos: estudo das alterações *post mortem* e diagnóstico toxicológico por meio da cromatografia em camada delgada**. 2004. 191 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

XAVIER, F. G.; KOGIKA, M. M.; SPINOSA, H. S. Common causes of poisoning in dogs and cats in a Brazilian veterinary teaching hospital from 1998 to 2000. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 115, 2002.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; FLÓRIO, J. C.; SPINOSA, H. S. Cromatografia em camada delgada para o diagnóstico da intoxicação por aldicarb (“chumbinho”) em cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 10-15, 2007.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. S. Fatal poisoning in dogs and cats – a 6 years report in a Veterinary Pathology Service. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 4, p. 304-309, 2007.

YOON, J.; OH, S.; YOO, S.; LEE, S.; LEE, H.; CHOI, S.; MOON, C.; LEE, B. N-nitrosocarbofuran, but not carbofuran, induces apoptosis and cell cycle arrest in CHL cells. **Toxicology**, v. 169, p. 153-161, 2001.