ADRIANA DE SIQUEIRA

Avaliação dos efeitos tóxicos dos carbamatos:

- I. Modelo experimental em ratos Wistar e comparação com a intoxicação exógena intencional em gatos e cães**
- II. Análise de estabilidade dos compostos e dos seus efeitos no *post mortem* imediato e em animais exumados**

**São Paulo
2015**

ADRIANA DE SIQUEIRA

Avaliação dos efeitos tóxicos dos carbamatos: I. Modelo experimental em ratos Wistar e comparação com a intoxicação exógena intencional em gatos e cães; II. Análise de estabilidade dos compostos e dos seus efeitos no *post mortem* imediato e em animais exumados

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

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo
2015

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.3109
FMVZ

Siqueira, Adriana de

Avaliação dos efeitos tóxicos dos carbamatos: I. Modelo experimental em ratos Wistar e comparação com a intoxicação exógena intencional em gatos e cães; II. Análise de estabilidade dos compostos e dos seus efeitos nos *post mortem* imediato e em animais exumados / Adriana de Siqueira. -- 2015.
101 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador.: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Aldicarbe. 2. Carbofurano. 3. Toxicologia. 4. Medicina veterinária legal.
5. Exumação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos tóxicos dos carbamatos e do forato: I - Modelo experimental em ratos e comparação com a intoxicação exógena intencional em gatos; II - Análise de estabilidade dos compostos e dos seus efeitos nos post-mortem", protocolado sob o nº 2301/2011, utilizando 68 (sessenta e oito) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo César Maiorka, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research "Evaluation of the toxic effects of the carbamates and the phorate: I- Experimental model in laboratory rats and comparison with the incidental poisoning towards cats; II - Estability analysis of the compounds and their effects througout post mortem", protocol number 2301/2011, utilizing 68 (sixty-eight) rats, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 15 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SIQUEIRA, Adriana de

Título: Avaliação dos efeitos tóxicos dos carbamatos: I. Modelo experimental em ratos Wistar e comparação com a intoxicação exógena intencional em gatos e cães; II. Análise de estabilidade dos compostos e dos seus efeitos no *post mortem* imediato e em animais exumados

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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Ao meu amado marido Atilio, por todo o amor, carinho e dedicação em todos os momentos. Meu grande companheiro nesta surpreendente caminhada da vida!

Aos meus saudosos pais, Dyrceu e Wilma, que foram meus grandes exemplos de vida, de quem tenho muito orgulho e que são a base do que sou e do que penso.

Aos meus irmãos, sempre grandes incentivadores na minha caminhada.

Aos meus animais, que, com seu amor incondicional, estimulam-me a acreditar na luta por um mundo melhor a eles e à grande família humana.

Aos animais de laboratório, todo o meu respeito.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo César Maiorka, pelo estímulo, confiança e bons conselhos.

Aos professores do Departamento de Patologia, em especial às professoras Helenice, Silvana e Claudia Mori, pela confiança e apoio na execução deste projeto.

Aos funcionários da Biotério do Departamento de Patologia.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, pela colaboração.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia, pela colaboração.

Aos funcionários do CEPTOX, Ester e PC, pela colaboração e pelas boas ideias.

Aos amigos Luciana, Fernanda, Samantha, Lilian Namazu, Anna, Leonardo, Livia, Buga, Raimundo, Edson, Ramon, Aline Ameni pelos momentos de descontração, de alegria, de apoio e pela amizade.

À aluna de Iniciação Científica Karina Borges, pela colaboração, apoio e aprendizado.

Aos colegas de pós-graduação André e Vagner, pelas discussões de âmbito toxicológico, ideias e pela empolgação na expectativa dos resultados.

Aos demais colegas de pós-graduação, pelas conversas e momentos de alegria.

Aos demais funcionários do Departamento de Patologia.

Aos funcionárias da Biblioteca da FMVZ-USP.

Aos residentes do Serviço de Patologia Animal, pela colaboração na coleta de material e pelas trocas de ideias nas necropsias.

À CAPES e ao CNPq (141973/2012-9) pela bolsa de estudo e à FAPESP (2012/23645-4) pelo financiamento do projeto.

*“Zero é igual a zero: a única evidência.
As outras sempre se prestam a discussões.”*

Mario Quintana

RESUMO

SIQUEIRA, A. de. **Avaliação dos efeitos tóxicos dos carbamatos**: I. Modelo experimental em ratos Wistar e comparação com a intoxicação exógena intencional em gatos e cães; II. Análise de estabilidade dos compostos e dos seus efeitos no *post mortem* imediato e em animais exumados. [Evaluation of the toxic effects of carbamates: I. Experimental model in Wistar rats and comparison with the intentional poisoning of cats and dogs; II. Analysis of the stability of the compounds and their effects in the immediate *post mortem* and in exhumed animals]. 2015. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

A intoxicação intencional de animais e de pessoas é uma ameaça à saúde e à segurança públicas em todo o mundo. No Brasil, os pesticidas da classe dos carbamatos aldicarbe e carbofurano são facilmente obtidos, e uma única dose letal daqueles é facilmente misturada a alimentos palatáveis e iscas. Foram analisadas as necropsias de 26 gatos e 10 cães, da rotina do Serviço de Patologia Animal da FMVZ-USP, com variados intervalos *post mortem* e tipos de conservação de carcaça, intoxicados pelos carbamatos aldicarbe e carbofurano, confirmados pela cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta performance com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Foram colhidas as matrizes biológicas para histopatologia e análise toxicológica. CLAE-DAD foi utilizada para detectar o aldicarbe e seus metabólitos, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, e carbofurano e seu metabólito 3-hidroxicarbofurano. As análises macroscópica e histopatológica revelaram predominantemente achados congestivos e hemorrágicos, o que pode ser resultante dos efeitos tóxicos dos carbamatos e seus metabólitos. Foram feitos 2 experimentos envolvendo exposição a uma dose única de carbofurano e de aldicarbe via gavagem em ratos Wistar. No primeiro, no qual foram avaliados os efeitos no *post mortem* imediato, 30 animais foram separados nos seguintes grupos: aldicarbe (n=10), carbofurano (n=10) e grupo controle (n=10). Os animais foram filmados para avaliar as alterações clínicas na intoxicação aguda e, quando foram sedados, foi colhido sangue por punção cardíaca para fazer o hemograma, bioquímica sérica, colinesterase e exame toxicológico e, após a eutanásia, foi feita a necropsia e colhido material para o exame histopatológico. Em todos os animais experimentais foi possível ser feita a detecção e a quantificação do aldicarbe e do carbofurano, além das alterações microscópicas congestivas e hemorrágicas, com alterações em parâmetros hematológicos e

bioquímicos. No segundo experimento, foram utilizados 30 animais, e o protocolo experimental foi idêntico ao experimento anterior, exceto que, após o óbito, os animais foram colocados em uma caixa com terra nos seguintes grupos: 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias e 10 dias, e em cada dia foram agrupados 2 animais intoxicados e 1 controle, sendo que as necropsias foram feitas nestes intervalos. Foram colhidos cérebro, pulmão, fígado e rim ao exame histopatológico e globo ocular, conteúdo gástrico, fígado e músculo esquelético ao exame toxicológico. Foram observadas as alterações tanatológicas e, em todas as matrizes analisadas, puderam ser quantificados o aldicarbe e/ou seus metabólitos aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, bem como o carbofurano e seu metabólito 3-hidroxicarbofurano. Estes estudos mostram a importância da necropsia e da coleta de matrizes diversas ao exame toxicológico, que são complementares e cruciais na investigação de óbitos decorrentes de intoxicações por praguicidas, tanto no *post mortem* imediato quanto em exumações.

Palavras-chave: Aldicarbe. Carbofurano, Toxicologia. Medicina veterinária legal. Exumação.

ABSTRACT

SIQUEIRA, A. de. **Evaluation of the toxic effects of carbamates**: I. Experimental model in Wistar rats and comparison with the intentional poisoning of cats and dogs; II. Analysis of the stability of the compounds and their effects in the immediate *post mortem* and in exhumed animals. [Avaliação dos efeitos tóxicos dos carbamatos: I. Modelo experimental em ratos Wistar e comparação com a intoxicação exógena intencional em gatos e cães; II. Análise de estabilidade dos compostos e dos seus efeitos no *post mortem* imediato e em animais exumados]. 2015. 101 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

The intentional poisoning of animals and people is a threat to public health and safety worldwide. In Brazil, the carbamate pesticides aldicarb and carbofuran are easily obtained. A single lethal dose of these carbamates is easily mixed with palatable food or baits. Necropsies and histopathological examinations of 26 cats and 10 dogs poisoned by the carbamates aldicarb and carbofuran were performed in the Service of Animal Pathology of FMVZ-USP, and the poisoning was confirmed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography with diode-array detector (HPLC-DAD), with variable *post mortem* interval and conservation of the carcass. Biological matrices were collected for histopathological and toxicological analysis. HPLC-DAD was utilised to detect aldicarb and its metabolites, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulphone, and carbofuran and its metabolite 3-hydroxycarbofuran. Gross and histopathological evaluations showed mainly congestive and haemorrhagic findings, which may result from the toxic effects of the carbamates and their metabolites. Two experimental protocols were performed in Wistar rats by exposing them to a single oral gavage dose to the carbamates aldicarb and carbofuran. The first experiment was performed to evaluate the immediate post mortem effects of carbamates, and 30 rats were divided into three groups: aldicarb (n=10), carbofuran (n=10) and control (n=10). The animals were filmed to evaluate the clinical signs of poisoning, and they were sedated to collect blood by heart puncture, to perform CBC, serum biochemistry, and to measure serum cholinesterase. After euthanasia, tissues were collected for histopathological evaluation. Aldicarb and carbofuran were detected and quantified in the blood of all experimental groups, and the most common histological changes observed were congestion and haemorrhage. In the second experiment, the experimental protocol was identical to the first one, but the animals were buried in a plastic box with garden

soil within 5 groups of 3 animals, two exposed to the same pesticide and 1 control, as follows: day 1, day 3, day 5, day 7 and day 10. The exhumations were performed within these days (1, 3, 5, 7 and 10). We collected brain, lung, liver and kidney to examine the thanatological changes, and the eyeballs, gastric content, liver and skeletal muscle to perform the toxicological screening. Thanatological changes could be observed within and between the groups, and, in all the matrices we could detect aldicarb and its metabolites aldicarb sulphoxide and aldicarb sulphone, and carbofuran and its metabolite 3-hydroxycarbofuran. The studies have shown the importance of the necropsy and the collection of diverse matrices to the toxicological screening, because both are complementary and crucial to the investigation of deaths by pesticides poisoning, even in exhumation, since we could evaluate the thanatological changes and correlate them to the action of the pesticides in the tissues.

Keywords: Aldicarb. Carbofuran. Toxicology. Forensic veterinary medicine. Exhumation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2	INTOXICAÇÃO EXÓGENA DE GATOS EM CÃES PELOS CARBAMATOS ALDICARBE E CARBOFURANO.....	18
2.1	INTRODUÇÃO	18
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	20
2.2.1	Necropsia e histopatologia	21
2.2.2	Boletim de ocorrência.....	22
2.2.3	Análise toxicológica	22
2.2.3.1	Coleta de amostras.....	22
2.2.3.2	A triagem por cromatografia em camada delgada (CCD)	22
2.2.3.3	Método de extração – CLAE.....	23
2.2.3.4	Método de análise pela cromatografia líquida de alta performance com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).....	23
2.3	RESULTADOS	24
2.4	DISCUSSÃO	30
2.5	CONCLUSÃO.....	35
3	A INTOXICAÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR PELOS CARBAMATOS ALDICARBE E CARBOFURANO INDUZ LESÕES HISTOLÓGICAS, ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, HEMATOLÓGICAS E PRODUZ SÍNDROME COLINÉRGICA.....	37
3.1	INTRODUÇÃO	37
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.2.1	Animais	39
3.2.2	Preparação da soluções de aldicarbe e de carbofurano	40
3.2.3	Protocolo experimental.....	40
3.2.4	Observação e avaliação dos sinais clínicos	41
3.2.5	Coleta de sangue e eutanásia	41
3.2.6	Necropsia e colheita de material biológico	41
3.2.7	Análise toxicológica.....	42
3.2.7.1	Extração líquido-líquido	42
3.2.7.2	Método de análise por CLAE-DAD	42
3.2.8	Análise estatística	43
3.3	RESULTADOS	44
3.3.1	Sinais clínicos da intoxicação experimental.....	44

3.3.2	Análise histopatológica	44
3.3.2	Análise estatística	49
3.3.2.1	Alterações histopatológicas	49
3.2.3.2	Hematologia e bioquímica sérica	57
3.2.3.3	Concentração sérica de acetilcolinesterase	58
3.2.3.4	Quantificações de aldicarbe e de carbofurano no sangue	59
3.3	DISCUSSÃO	59
3.4	CONCLUSÃO.....	62
4	EXUMAÇÃO COMO INSTRUMENTO DE INVESTIGAÇÃO EM CASOS DE INTOXICAÇÃO PELOS CARBAMATOS ALDICARBE E CARBOFURANO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR.....	63
4.1	INTRODUÇÃO	63
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	65
4.2.1	Animais	65
4.2.2	Preparação da soluções de aldicarbe e de carbofurano	66
4.2.3	Protocolo experimental.....	66
4.2.4	Eutanásia, coleta de sangue e formação dos grupos	66
4.2.5	Procedimentos para exumação	67
4.2.6	Necropsia e colheita de material biológico	68
4.2.7	Exame toxicológico.....	68
4.2.7.1	Extração líquido-líquido	68
4.2.7.2	Método de análise por CLAE-DAD	69
4.3	RESULTADOS	70
4.3.1	Análise de temperatura e umidade	70
4.3.2	Análise macroscópica.....	71
4.3.3	Análise microscópica.....	72
4.3.4	Concentrações de aldicarbe e de carbofurano.....	80
4.4	DISCUSSÃO	82
4.5	CONCLUSÃO.....	85
5	CONCLUSÃO GERAL.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Medicina Legal se constitui em um elo entre as ciências médicas e o Direito, dado que nela aplicam-se os conhecimentos de seus diversos ramos para esclarecer os fatos de natureza biológica em serviço da Lei (FRANÇA, 2011). Entretanto, as Ciências Forenses se constituem um grupo multidisciplinar que engloba a Medicina Legal e suas subáreas, como Toxicologia, Tanatologia, Traumatologia, dentre outros.

Os conceitos supracitados se aplicam à Medicina Veterinária, na área de Medicina Veterinária Legal (MARLET et al., 2012; MARLET; MAIORKA, 2012), a qual apresentou crescimento acentuado nos últimos anos, sobretudo devido aos casos de maus tratos contra animais (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; MARLET; MAIORKA, 2010; SIQUEIRA; CASSIANO; MAIORKA, 2011; DE SIQUEIRA et al., 2012; YOSHIDA; SIQUEIRA; MAIORKA, 2014), que vêm se tornando uma grande causa de mortalidade e de morbidade (SINCLAIR; LOCKWOOD, 2005; SINCLAIR; MERCK; LOCKWOOD, 2006; MERCK, 2012a; GERDIN; MCDONOUGH, 2013), sendo que as intoxicações exógenas intencionais por carbamatos são um dos principais meios utilizados para tais práticas (SINCLAIR; LOCKWOOD, 2005; SINCLAIR; MERCK; LOCKWOOD, 2006; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; MARLET; MAIORKA, 2010; ANASTASIO; SHARP, 2011; SIQUEIRA; CASSIANO; MAIORKA, 2011; DE SIQUEIRA et al., 2012; MERCK, 2012a). Deste modo, a Toxicologia fornece métodos para a análise e a investigação das substâncias utilizadas que possivelmente causaram o óbito de um animal, e fornece subsídios ao médico veterinário patologista para estabelecer a *causa mortis* (FERSLEW; HAGARDORN; MCCORMICK, 1992; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007b; WYMAN, 2012; DRUMMER et al., 2013).

A necropsia forense é um instrumento cada vez utilizado neste casos, haja vista que possuem potencial jurídico, o que torna mandatário o registro, a identificação e a documentação fotográfica de todo o procedimento, para garantir a rastreabilidade das amostras, a qual se denomina cadeia de custódia (MUNRO, 1998; COOPER; COOPER, 2008; GERDIN; MCDONOUGH, 2013; SALVAGNI et al., 2014). Muitas vezes o intervalo *post mortem* é desconhecido, ou o cadáver ficou exposto a condições climáticas deletérias, como calor ou frio extremo, o que pode

ser prejudicial à necropsia e a coleta de material para exame histopatológico e toxicológico (MUNRO, 1998; SINCLAIR; MERCK; LOCKWOOD, 2006; COOPER; COOPER, 2008; SKOPP, 2010; DRUMMER et al., 2013; GERDIN; MCDONOUGH, 2013, SALVAGNI et al., 2014). Nestes casos podem haver a distribuição *post mortem* das substâncias, portanto, dependendo do local da coleta da matriz, a concentração dos analitos pode variar bruscamente (MORIYA; HASHIMOTO, 1999; CAMPELO; CALDAS, 2010; SKOPP, 2010; DRUMMER et al., 2013). Outro tipo de situação é a exumação, que é o desenterramento do cadáver, sua avaliação necroscópica e de todos os vestígios encontrados próximos a ele, sendo factível fazer a análise toxicológica e histopatológica nestes casos, já que substâncias podem ser detectadas após muito tempo decorrido do óbito (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; SPILLER; PFIEFER, 2007; MIRZA et al., 2012; KÄFERSTEIN et al., 2013).

A análise toxicológica pode ser realizada a partir de diversas matrizes colhidas na necropsia, como conteúdo gástrico, sangue periférico, fígado e rim (MELITO; FLORIO, 2006; XAVIER et al., 2007; BUTZBACH, 2010; SKOPP, 2010; WYMAN, 2012; DRUMMER et al., 2013). O principal agente utilizado para intoxicar intencionalmente é o aldicarbe, cuja forma mais utilizada é em grânulos enegrecidos, comumente chamado de “chumbinho” (NELSON et al., 2001; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007b; CAMPELO; CALDAS, 2010; REBELO et al., 2011; BUCARETCHI et al., 2012), que recentemente teve seu uso banido pela ANVISA devido ao alto índice de intoxicações acidentais e intencionais, que ainda assim pode ser adquirido clandestinamente. Entretanto, o carbofurano, um praguicida que também pertence à classe dos carbamatos, também vem sendo utilizado com o mesmo fim, com efeitos tóxicos muito semelhantes aos do aldicarbe (FERSLEW; HAGARDORN; MCCORMICK, 1992; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; FLEISCHLI et al., 2004; RIZOS et al., 2004b; OTIENO et al., 2010; BUCARETCHI et al., 2012). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) é uma técnica utilizada para detectar o aldicarbe e seus metabólitos aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, além do carbofurano e de seu metabólito, 3-hidroxicarbofurano, apresentando resultados robustos (NISSE et al., 2002; OTIENO et al., 2010; SAKUNTHALA TENNAKOON; KARUNARATHNA; UDUGAMPALA, 2013).

Estas substâncias são potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase, causando a síndrome colinérgica (GUPTA, 1994; HOFFMANN; HECKER; ABEL, 2008; LEIBSON; LIFSHITZ, 2008; GIADINIS et al., 2009; ARNOT et al., 2011; INDIRA; ANDREWS; RAKESH, 2013), como êmese, diarreia, aumento da frequência de micção, broncorreia, bradicardia, miose, resultantes da hiperestimulação muscarínica, e taquicardia, hipertensão, depressão respiratória, fasciculação muscular, fraqueza muscular e paralisia são resultantes da hiperestimulação nicotínica, os quais são comumente relatados pelos proprietários de animais intoxicados (RISHER; MINK; STARA, 1987; GUPTA, 1994; OTIENO et al., 2010; ANASTASIO; SHARP, 2011; ARNOT et al., 2011). Muitas destas alterações clínicas podem ser um indicativo de lesões encontradas na necropsia, já que, por exemplo as alterações respiratória podem ser decorrentes tanto dos efeitos tóxicos direto no pulmão, quanto em tronco cerebral (RISHER; MINK; STARA, 1987; GUPTA, 1994; BONHAM, 1995; BURTON; KAZEMI, 2000; ANASTASIO; SHARP, 2011; ARNOT et al., 2011).

Os objetivos do presente estudo são avaliar a casuística de gatos e cães intoxicados por carbamatos do Serviço de Patologia Animal da FMVZ-USP, além de realizar exposições agudas aos carbamatos em ratos Wistar para avaliar as alterações histopatológicas, hematológicas e bioquímicas decorrentes dos efeitos tóxicos destas substâncias no *post mortem* imediato, bem como nos animais exumados.

2 INTOXICAÇÃO EXÓGENA DE GATOS EM CÃES PELOS CARBAMATOS ALDICARBE E CARBOFURANO

2.1 INTRODUÇÃO

A intoxicação intencional de animais e de pessoas é uma ameaça à Saúde e à Segurança Públicas em todo o mundo (GRENDON; FROST; BAUM, 1994; PROENÇA et al., 2004; MACFARLANE et al., 2011). Desde outubro de 2012, a Agência Nacional de Vigilância em Saúde (ANVISA) proibiu a utilização do aldicarbe no Brasil, conhecido no cenário da criminalidade como “chumbinho”, embora isso não tenha parado ou mesmo diminuído os casos de intoxicação por esta substância. São conhecidos por sua ação como inibidores reversíveis da enzima acetilcolinesterase (AChE) (RISHER; MINK; STARA, 1987; BARON, 1994), e são comum e ilegalmente utilizados como para matar animais e pessoas (MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; NOVOTNÝ et al., 2011; REBELO et al., 2011); utilizados como método de homicídio/suicídio (PROENÇA et al., 2004; RIZOS et al., 2004b) ou utilizado erroneamente como raticida ilegal (LIMA; REIS, 1995; CAMPELO; CALDAS, 2010; REBELO et al., 2011). Estas substâncias são obtidas facilmente e rapidamente consumidas pelas espécies-alvo, sendo misturadas a alimentos palatáveis ou iscas, geralmente em uma única dose letal (FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007a, 2007c). O proprietário geralmente encontra o animal morto os apresentando sinais clínicos graves comuns na síndrome colinérgica como dispneia, diarreia ou convulsão (RISHER; MINK; STARA, 1987; RIZOS et al., 2004b; KHAN, 2012), o que requer uma intervenção médico-veterinária imediata. O vômito ou a diarreia podem ser encontrados próximos ao animal, além de restos de alimentos ou iscas contaminados (FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c).

Nos últimos anos, proprietários de gatos e cães tem procurado a polícia para relatar tais morte sob circunstâncias suspeitas, e então é produzido um Boletim de ocorrência (B.O.), o que deve culminar em uma investigação criminal. A Lei Federal de Meio Ambiente no 9605/1998, de 12 de fevereiro de 1998 considera crime a

crueldade e abuso contra animais. Entretanto, mudanças no Código Penal, em tramitação no Congresso Nacional Brasileiro, visam considerar os maus tratos e a crueldade contra animais também como crime nas instâncias civil e criminal, não somente no âmbito ambiental, portanto atos maliciosos que culminem na morte do animal, como a intoxicação exógena intencional, teriam a pena aumentada. Esta situação reforça a importância da pesquisa e a utilização da abordagem forense para analisar os crimes contra os animais, conforme relatado em estudos recentes (MUNRO, 1998; COOPER; COOPER, 2008; BYARD; BOARDMAN, 2011; NEWBERY; MUNRO, 2011; GERDIN; MCDONOUGH, 2013; MUNRO; MUNRO, 2013). Nos casos de mortes de pessoas sob circunstâncias violentas, desconhecidas ou suspeitas, estes são realizados por médicos legistas, o que ocorre de modo similar em outros países (RANDALL; FIERRO; FROEDE, 1998; FIERRO, 2005; MOLINA; WOOD; FROST, 2007). Já em casos sob circunstâncias similares em animais, as necropsias são realizadas por médicos veterinários patologistas, os quais devem estar atentos sobre as possíveis circunstâncias que podem ter levado o animal à morte, e seguir protocolos estabelecidos, tanto para a necropsia quanto para a coleta de amostras para a histopatologia e para a análise toxicológica. O toxicologista deve sempre ser consultado sobre quais as matrizes apropriadas segundo as suspeitas do veterinário patologista, assim como o melhor método de manipular e de conservar as amostras, para assim obter resultados consistentes e confiáveis (MUNRO, 1998; FLANAGAN; AMIN; SEINEN, 2003; COOPER; COOPER, 2008; BYARD; BOARDMAN, 2011; WYMAN, 2012; DRUMMER et al., 2013).

A maioria dos animais intoxicados intencionalmente por carbamatos geralmente apresentam um conjunto de alterações macroscópicas e histopatológicas, tais como congestão sistêmica e múltiplas áreas de hemorragia (GRENDON; FROST; BAUM, 1994; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007a; NOVOTNÝ et al., 2011). Entretanto, o método de conservação do cadáver, como congelamento ou a exposição às condições climáticas, pode prejudicar tanto a análise macroscópica quanto a microscópica, o que é primordial para diferenciar a intoxicação exógena por carbamatos de doenças que possa apresentar lesões similares (MUNRO, 1998; FIERRO, 2005). Isto só pode ser feito uma vez que uma análise histopatológica completa seja realizada (FIERRO, 2005; CHATELAIN et al., 2012).

Um problema recorrente nos casos de crimes contra animais, incluindo os de intoxicação exógena intencional por carbamatos, é que a cena do crime raramente é preservada e examinada, o que prejudica a investigação criminal (SINCLAIR; MERCK; LOCKWOOD, 2006; MERCK, 2012b). Por este motivo, a cadeia de custódia só pode ser iniciada e garantida quando o animal é trazido para necropsia, recebe um número de registro, e pode ser mantido depois de as amostras serem enviadas ao laboratório de toxicologia (FLANAGAN; CONNALLY; EVANS, 2005; WYMAN, 2012).

A triagem toxicológica pode desempenhar um papel crucial nos casos de cunho médico-legal. A acurácia e a especificidade da identificação de possíveis agentes tóxicos pode levar um tempo prolongado, haja vista o potencial jurídico do caso, e garantir a confiabilidade da amostra, e a amostra deve ser mantida sob uma cadeia de custódia rigorosa (DE ZEEUW, 2004; SKOPP, 2010; WYMAN, 2012; DRUMMER et al., 2013). Por isso a análise toxicológica para detectar o aldicarbe, o carbofurano e seus metabólitos por causa de sua semelhança macroscópica. Os metabólitos aldicarbe sulfona (ASN) e aldicarbe sulfóxido (ASX) apresentam maior ação anticolinesterásica do que o próprio aldicarbe; ASX é 23 vezes mais efetivo do que o aldicarbe e 60 vezes mais efetivo do que o ASN (MONTESISSA et al., 1994). A cromatografia líquida de alta performance com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) tem sido realizada para este propósito e tem demonstrado resultados consistentes (HARPER; WEISSKOPF; COBB, 1998; OTIENO et al., 2010).

O objetivo deste estudo é apresentar as principais alterações macroscópicas e microscópicas nos gatos e cães intoxicados intencionalmente por carbamatos, em combinação com a triagem toxicológica de matrizes biológicas dos animais intoxicados por CLAE-DAD, a fim de realçar a importância da contribuição destas análises na investigação de crimes contra animais.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Entre agosto de 2011 e agosto de 2013 foram realizadas no Serviço de Patologia Animal da FMVZ-USP, 10 necropsias de cães e 26 de gatos cuja suspeita

de morte foi a síndrome tóxica exógena possivelmente causada pelos carbamatos aldicarbe e carbofurano. Em todos os casos os achados macroscópicos foram fotografados, e amostras de órgãos e outras matrizes biológicas, tais como sangue periférico, cardíaco e humor vítreo, foram coletadas para realizar as análises histopatológica e toxicológica. Salienta-se que todas as amostras de conteúdo gástrico foram analisadas pelo método de cromatografia por camada delgada, quando disponíveis, pois há casos nos quais os animais vomitam, não restando qualquer conteúdo analisável no estômago. As análises toxicológicas foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da FMVZ-USP, conforme já realizado em estudos anteriores de nosso Departamento (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007a).

Foram colhidos os dados relativos aos animais, como espécie, raça, sexo, método de conservação da carcaça, o tempo entre o óbito e a necropsia, bem como outras informações acerca das possíveis circunstâncias do óbito relatadas pelos proprietários. Os boletins de ocorrência (B.O.) também foram avaliados, quando disponíveis, quanto a informações de suspeitos e suas possíveis motivações. Foi desenvolvido um banco de dados utilizando o software Excel®.

2.2.1 Necropsia e histopatologia

A documentação fotográfica foi feita utilizando-se uma régua graduada, na qual constava a identificação do animal e do número da necropsia. Todas as lesões externas e alterações *post mortem* foram registradas, como autólise, putrefação, bem como a presença de larvas. Ao exame interno, todas as vísceras foram fotografadas e examinadas. Foram colhidos cerca de quatro fragmentos do pulmão, coração, fígado, estômago, rim e pâncreas, sempre que possível, de um modo aleatório e uniforme, para propiciar uma análise acurada. O cérebro foi dividido em 4 partes: encéfalo, cerebelo, ponte e medula, e foi colhido um fragmento de cada parte. Estas amostras foram fixadas em solução de formol a 10% e receberam o processamento de rotina. Desse material foram confeccionadas laminais histológicas, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), que foram analisadas por dois patologistas veterinários no microscópio óptico.

2.2.2 Boletim de ocorrência

Os boletins de ocorrência foram analisados, quando disponíveis, para obter informações sobre quem possivelmente intoxicou os animais, as motivações para se cometer tal crime, bem como os achados da cena do crime. Para prosseguir com a investigação criminal, os delegados de polícia requisitavam a necropsia e o exame toxicológico.

2.2.3 Análise toxicológica

2.2.3.1 Coleta de amostras

As amostras para a análise toxicológica foram colhidas na necropsia e embaladas individualmente, sendo lacradas com lacre plástico numerado. Para tanto, foram colhidos o conteúdo gástrico, sangue periférico, e fragmentos de fígado, de pulmão e o humor vítreo quando possível. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Toxicologia, no qual as amostras foram registradas e mantidas a -20° C até a análise, que não excedeu 10 dias.

2.2.3.2 A triagem por cromatografia em camada delgada (CCD)

Todos os conteúdos gástricos foram triados pela CCD. O padrão técnico de aldicarbe utilizado na análise química mostrou pureza de 99,7%. Foram utilizados os seguintes reagentes: diclorometano, acetona, éter, cloreto de sódio, sulfato de sódio anidro, cloreto de platina e iodeto de potássio. Todos os procedimentos analíticos foram realizados em fluxo laminar. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando cromatoplasmas com fase estacionária composta de sílica gel 60, sem indicador de fluorescência, com as dimensões 10 x 20 cm. A placa foi ativada

utilizando-se um forno (100° C) por duas horas antes do uso. O aldicarbe foi extraído da matriz utilizando-se uma solução de diclorometano:acetona:éter (1:1:1), de acordo com técnicas cromatográficas padrão, com o uso do solvente eluente a base de n-acetona-hexano (4:1). As amostras foram consideradas positivas ao descolorir o cromógeno (iodeto de platina), ao formar manchas do mesmo modo e ao mesmo tempo que as produzidas pelo padrão (mesmo fator de retenção). Os procedimentos analíticos utilizados em cada amostra foram obtidos em até 4 horas após o descongelamento da amostra até a leitura na placa. Os controles negativos foram conteúdos gástricos de animais que não morreram devido a intoxicação exógena (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007a).

2.2.3.3 Método de extração – CLAE

Os melhores índices de recuperação dos carbamatos e metabólitos em matrizes biológicas foram obtidos conforme os seguintes procedimentos: 1) foi utilizado 5 mL de sangue, 1 mL de humor vítreo ou 5 g de matrizes biológicas; a essas matrizes foi adicionado o padrão interno 2) foi adicionado na proporção de 1:1 uma mistura de éter:clorofórmio 3) Foi realizada a agitação por 30 minuto em agitador tipo vortex automático; 4) após a agitação foi realizada uma centrifugação a 4000 rpm sobre uma temperatura de 4°C por 30 minutos; 5) a porção etérea foi separada e filtrada através de sulfato de sódio anidro 6) o resíduo da filtração foi evaporado em capela a temperatura ambiente e o mesmo foi reconstituído com acetonitrila a qual foi filtrada em filtros de poros de 0,22 um, esse extrato foi injetada no cromatógrafo.

2.2.3.4 Método de análise pela cromatografia líquida de alta performance com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

As condições ótimas de separação e análise dos carbamatos e metabólitos foram obtidas utilizando-se fluxo de 1,0 mL/min no modo de eluição gradiente com

programação linear, iniciando com 100% de água e 0% de acetonitrila (ACN) até 80% de ACN/H₂O em 30 min; temperatura da coluna selecionada em 30°C; volume de injeção 20 µL e detector de arranjo de diodos, selecionado para detecção simultânea nos seguintes comprimentos de onda: 203 e 246. O comprimento de onda de absorção para o aldicarbe foi 246 nm; para 3-hidroxicarbofurano, aldicarbe sulfóxido, aldicarbe sulfona, carbofurano, metiocarbe e forato em 203 nm. Nestas condições, os carbamatos e metabólitos foram analisados em uma corrida cromatográfica de 30 minutos. Após cada análise a coluna foi limpa com 50% de ACN/H₂O até 100% de ACN em 5 minutos. O retorno às condições iniciais para nova análise foi de 100% de ACN até 100% de água. A coluna foi mantida nas condições iniciais de análise por 10 minutos antes de nova injeção para estabilização.

2.3 RESULTADOS

Foram realizadas necropsias de 26 gatos e 10 cães com suspeita de intoxicação intencional fatal por carbamatos, e que viviam na área urbana. Com relação aos gatos, 38,5% (10/26) eram fêmeas e 61,5% (16/26) eram machos, com idades entre 3 meses e 14 anos de idade. Já os cães apresentaram distribuição igualitária entre machos e fêmeas, com idades entre 11 meses e 14 anos. Na tabela 1 está descrita a amostra em questão.

Tabela 1 - Relação dos cães e gatos intoxicados por carbamatos com relação a idade, sexo, raça, tempo decorrido entre o óbito e a necropsia e solicitante da necropsia recebidos pelo Serviço de Patologia Animal – FMVZ-USP

(continua)

#	Espécie	Idade	Sexo*	Raça ¹	Tempo decorrido entre o óbito e a necropsia ²	Método de conservação do cadáver	Solicitante de instituição pública – centro de controle de zoonoses ou polícia
1	Canina	5 anos	F	Pitbull	1 mês	Nenhum	Não
2	Felina	Jovem	M	SRD	N.I.	Congelamento	Sim (Polícia)
3	Felina	Adulto	M	SRD	N.I.	Congelamento	Sim (Polícia)
4	Felina	6 meses	F	SRD	N.I.	Nenhum	Sim (Polícia)
5	Felina	3 meses	M	SRD	N.I.	Nenhum	Sim (Polícia)
6	Canina	Adulto	F	Poodle	2 dias	Resfriamento	Sim (Polícia)
7	Felina	Adulto	M	SRD	N.I.	Nenhum	Sim (Polícia)
8	Felina	Adulto	F	SRD	N.I.	Nenhum	Sim (Polícia)
9	Felina	8 meses	M	SRD	1 dia	Resfriamento	Sim (Polícia)
10	Felina	2 anos	F	SRD	1 dia	Resfriamento	Sim (Polícia)
11	Felina	Jovem	F	SRD	7 dias	Congelamento	Sim (Polícia)
12	Felina	6 meses	M	SRD	1 dia	Nenhum	Não
13	Felina	3 anos	F	SRD	2 dias	Congelamento	Não
14	Felina	1 ano	M	SRD	3 dias	Nenhum	Sim (Polícia)
15	Felina	4 meses	M	SRD	3 dias	Nenhum	Sim (Polícia)
16	Felina	1 ano	M	SRD	1 dia	Congelamento	Sim (CCZ ³)
17	Felina	Adulto	F	SRD	1 dia	Nenhum	Não
18	Felina	4 meses	M	SRD	N.I.	Nenhum	Não
19	Felina	3 anos	M	SRD	1 dia	Resfriamento	Não
20	Canina	3 anos	F	Border Collie	1 dia	Resfriamento	Não
21	Canina	1 ano	F	SRD	1 dia	Resfriamento	Não
22	Felina	1 a 4m	F	SRD	1 dia	Resfriamento	Não
23	Canina	14 anos	M	Golden retriever	2 dias	Resfriamento	Não
24	Canina	11 meses	M	Maltês	N.I.	Nenhum	Não
25	Felina	1 ano	F	SRD	9 dias	Congelamento	Sim (Polícia)
26	Canina	4 anos	M	SRD	8 dias	Congelamento	Não
27	Canina	4 anos	F	Doberman pinscher	1 dia	Nenhum	Não
28	Canina	2 anos	M	SRD	1 dia	Resfriamento	Sim (Polícia)
29	Felina	Adulto	M	SRD	N.I.	Congelamento	Sim (CCZ)
30	Felina	Jovem	M	SRD	N.I.	Congelamento	Sim (CCZ)
31	Felina	Adulto	M	SRD	N.I.	Congelamento	Sim (CCZ)
32	Felina	Adulto	F	SRD	N.I.	Congelamento	Sim (CCZ)
33	Canina	6 anos	M	SRD	N.I.	Resfriamento	Sim (CCZ)
34	Felina	1 ano	M	SRD	1 dia	Nenhum	Não
35	Felina	10 anos	F	SRD	11 dias	Congelamento	Não
36	Felina	1 ano	M	SRD	N.I.	Resfriamento	Não

*M=macho; F=fêmea; ¹SRD=sem raça definida; ²=NI – não informado; ³=CCZ-Centro de Controle de Zoonoses

Fonte: (SIQUEIRA, 2014).

Entre os seis animais trazidos para necropsia pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), quatro eram animais de uma mesma propriedade que haviam ingerido peixe contendo grânulos enegrecidos. Dentre os 14 animais que vieram acompanhados por Boletim de Ocorrência (B.O.), em 57,1% dos casos (8/14) houve

ameaça de vizinhos, e em dois casos, havia uma conexão entre violência doméstica e brigas familiares com a morte do animal. Por fim, em quatro casos o Delegado de Polícia solicitou que fosse realizada a necropsia para assim se lavrar o B.O.

Para alguns proprietários, as circunstâncias do óbito eram desconhecidas, mas com frequência eles relataram achados suspeitos de intoxicação intencional, tais como alimentos ou iscas com grânulos enegrecidos próximos ao animal, além de ameaças prévias de vizinhos. As principais lesões macroscópicas encontradas nos animais intoxicados estão descritas na tabela 2 e demonstradas na figura 1.

Tabela 2 – Gatos e cães intoxicados pelos carbamatos aldicarbe/carbofurano: frequência das principais alterações macroscópicas

Órgão	Lesão macroscópica	Gatos (n = 26) n (%)	Cães (n=10) n (%)
Cérebro*	congestão	18 (69,2)	9 (90,0)
	hemorragia	-	1(10,0)
Pulmão	congestão	20(76,9)	9(90,0)
	hemorragia	7(26,9)	5(50,0)
	edema	3(11,5)	2(20,0)
Coração	Embebição hemoglobínica	5(19,2)	1(10,0)
	Hemorragia	3(11,5)	1(10,0)
	Grânulos enegrecidos misturados ao conteúdo**	21(80,8)	8(80,0)
	Grânulos enegrecidos misturados ao muco	5(19,2)	-
Estômago	Grânulos acinzentados misturados ao conteúdo	-	1(10,0)
	Congestão	2(7,7)	1(10,0)
	Congestão	9(34,6)	4(40,0)
Pâncreas	Hemorragia	13(50,0)	5(50,0)
	Congestão	17(65,4)	6(60,0)
Fígado	Hemorragia	1(3,8)	-
	Padrão lobular	4(15,4)	-
Rim	Congestão	18(69,2)	7(70,0)
	Hemorragia subcapsular	1(3,8)	-

* a congestão era difusa no cérebro, cerebelo, ponte e medula, e havia hemorragia focal no cerebelo e na ponte; ** a coloração dos grânulos pode variar de acordo com o fabricante e a substância

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 1 – Fotografias macroscópicas de órgãos de cães e gatos intoxicados por carbamatos

Legenda: A: Estômago: grânulos enegrecidos entremeados ao conteúdo gástrico (setas pretas); B: Fígado: Fraturas nos lobos hepáticos (setas brancas), áreas de lipidose (seta preta) e áreas avermelhadas (congestão – asterisco branco); C – Cérebro: vasos sanguíneos e evidenciados por toda a superfície, bem como áreas multifocais de hemorragia meningeal; D - Duodeno e pâncreas. Áreas multifocais de coloração vermelho-escuro (hemorragia – setas pretas); E – Rim e vesícula urinária. A junção corticomedular apresenta coloração avermelhada (setas brancas – congestão). Foco hemorrágico na vesícula urinária (setas pretas); F - Pulmão: áreas focais de coloração vermelho-escuro (hemorragia-setas pretas) e focos de enfisema (setas brancas). Notar que o parênquima apresenta áreas avermelhadas (congestão).
Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Além disso, também foram encontrados em três gatos hemorragia no timo. Havia sinais de trauma em dois gatos – um apresentou ruptura hepática e o outro apresentou múltiplas fraturas nas costelas e lacerações no pulmão, com grande quantidade de sangue livre nas cavidades torácica e abdominal. Um gato estava muito putrefato, e dois gatos apresentavam incontáveis larvas de insetos no globo ocular, face e membros. Outro achado apresentado pelos animais intoxicados era a hemorragia na cavidade oral de dois cães (20,0%) e no rostro/cavidade nasal em nove gatos (34,6%). Os alimentos e iscas comumente encontrados eram ração úmida ou seca para cães e gatos, pedaços de salsicha, arroz, peixe e ossos. Os grânulos enegrecidos também eram encontrados no esôfago, duodeno, língua e glote de dois cães e um gato. Em dois casos, o proprietário trouxe o vômito. As lesões histopatológicas mais comumente encontradas nos animais intoxicados estão descritos na tabela 3 e na figura 2.

Tabela 3 – Gatos e cães intoxicados pelos carbamatos aldicarbe/carbofurano: frequência das principais lesões histológicas

Órgão	Lesão histológica	Gatos (n=26) n (%)	Cães (n=10) n (%)
Cérebro*	congestão	16 (61,5)	8 (80,0)
	congestão meningeal	3 (11,5)	3 (30,0)
	hemorragia	2 (7,7)	1 (10,0)
	congestão	15 (57,7)	8 (80,0)
Pulmão	edema	15 (57,7)	3 (30,0)
	hemorragia	8 (30,8)	4 (40,0)
	enfisema	11 (42,3)	-
	congestão	15 (57,7)	4 (40,0)
Coração	hemorragia	2 (7,7)	1 (10,0)
	miocardite	1 (3,8)	-
Estômago	inflamação aguda	6 (23,1)	4 (40,0)
	necrose	12 (46,2)	2 (20,0)
Pâncreas	congestão	15 (57,7)	6 (60,0)
	hemorragia	8 (30,8)	3 (30,0)
Fígado	congestão	15 (57,7)	7 (70,0)
	hemorragia	1 (3,8)	1 (10,0)
Rim	congestão	16 (61,5)	8 (80,0)
	hemorragia	-	1 (10,0)

*a maioria das lesões foram encontradas no cerebelo e na ponte, em que eram multifocais, tanto na meninge quanto no parênquima; a hemorragia era focal na ponte no cão, e no gato situava-se tanto no cerebelo quanto na ponte.

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 2 – Fotomicrografias de órgãos de cães e gatos intoxicados por carbamatos

Legenda: A: Fígado. Áreas multifocais a coalescentes de degeneração macrogoticular (asterisco) e áreas de congestão (setas). Coloração HE. Barra = 500 μ m; B: Cérebro. Congestão da paquimeninge (seta preta), congestão multifocal do parênquima e autólise neuronal (asterisco). Coloração HE. Barra = 100 μ m; D: Pulmão. Notar o edema difuso (asterisco), congestão e hemorragia. Coloração HE. Barra = 10 μ m; E: Rim. Notar a congestão multifocal (asterisco), degeneração glomerular e tubular. Coloração HE. Barra = 10 μ m
Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

As matrizes biológicas foram triadas no CLAE-DAD para o aldicarbe e seus metabólitos aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, para o carbofurano e o seu metabólito 3-hidroxicarbofurano, e ao forato. Os tempos de retenção para as substâncias foram 8,575 ao aldicarbe sulfona, 11,327 para o aldicarbe sulfóxido, 14,521 para o aldicarbe, 17,043 para o carbofurano, 16,388 para o 3-hidroxicarbofurano e 27,083 ao forato. O sangue periférico foi a matriz biológica eleita para esse estudo, porém quando não estava disponível devido a dificuldades de coleta, foram utilizadas outras matrizes, tais como conteúdo gástrico, humor vítreo, fígado e pulmão. Nos casos seguintes, previamente descritos na Tabela 1, foi testada mais de uma matriz com resultado positivo: animal 6 – sangue e fígado, animal 11 – sangue e fígado, animal 21 – humor vítreo e fígado, e animal 33 – humor vítreo, fígado e pulmão. As amostras dos animais 17 e 33 apresentaram resultado negativo no sangue, e a amostra 20 foi negativa para o fígado. Todas as

amostras forma negativas para o forato. Foram testadas 42 matrizes de 36 animais, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Gatos e cães intoxicados pelos carbamatos aldicarbe/carbofurano: avaliação toxicológica para detectar o aldicarbe, seus metabólitos, o carbofurano, e sua frequência nas amostras testadas

Substância	n	%	Matriz*
Aldicarbe sulfona	11	26,2	sangue (n=9); fígado (n=1); humor vítreo (n=1)
Aldicarbe	9	21,4	sangue (n=6); fígado (n=1); humor vítreo (n=1); pulmão (n=1)
Aldicarbe sulfóxido	8	19,0	sangue (n=5); fígado (n=3)
Aldicarbe + aldicarbe sulfóxido	5	11,9	sangue (n=4); fígado (n=1)
Aldicarbe + aldicarbe sulfona	3	7,1	sangue (n=2); fígado (n=1)
Aldicarbe + aldicarbe sulfona + aldicarbe sulfóxido	3	7,1	conteúdo gástrico (n=3)
Aldicarbe sulfóxido + aldicarbe sulfona	1	2,4	sangue (n=1)
Aldicarbe sulfona + carbofurano	1	2,4	sangue (n=1)
Carbofurano	1	2,4	sangue (n=1)
Total	42	100,0	

*as matrizes também foram testadas ao 3-hidroxicarbofurano, com resultado negativo

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

2.4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que ainda há mortes de cães e gatos no Brasil devido a intoxicação exógena intencional pelos praguicidas do grupo dos carbamatos aldicarbe e carbofurano. Os dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico- Farmacológicas (SINITOX) em 2010 demonstraram que houve 5.463 casos de intoxicação em humanos por praguicidas em contraposição ao 147 casos em animais. Destes casos, houve 175 tentativas de suicídio, 3 casos de homicídios e 8 casos de intoxicação acidental, o que também é relatado em outros países (NELSON et al., 2001; PROENÇA et al., 2004; LEIBSON; LIFSHITZ, 2008; MACFARLANE et al., 2011; BUCARETCHI et al., 2012). Com relação aos casos de intoxicação acidental em bovinos e ovinos (GRENDON; FROST; BAUM, 1994; FRAZIER et al., 1999) e os de intoxicação intencional de animais de estimação (DE SIQUEIRA et al., 2012; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; NOVOTNÝ et al., 2011; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c), há indícios de que os dados oficiais não são representativos do cenário da intoxicação de animais domésticos no Brasil, conforme

discutido em estudos anteriores (XAVIER et al., 2007; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007a). Portanto, os achados do presente estudo corroboram no sentido de que há discrepâncias entre os dados oficiais e a realidade, configurando que a intoxicação exógena de animais é, de fato, um problema de Saúde e de Segurança Pública, este último piorado pelo fato de haver a aquisição ilícita dos carbamatos aldicarbe e carbofurano. Devido a este aspecto criminal, considerando a compra e a intoxicação exógena intencional de animais, a investigação é crucial para determinar a fonte do “chumbinho”, e isto pode ser auxiliado pela confirmação da intoxicação fatal de gatos e cães. Além disso, como os carbamatos não tem uso preconizado como raticidas, o que poderia proporcionar um aspecto accidental à intoxicação, o que não é o caso segundo os relatos dos proprietários nos boletins de ocorrência e nas requisições de necropsia, sendo assim, os casos apresentados apresentam motivação intencional, o que pode ser confirmado somente pela investigação criminal.

Em contraposição a achados anteriores (FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; FORRESTER; STANLEY, 2004; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c), o gato doméstico foi o mais afetado nos casos de intoxicação exógena intencional. Conforme demonstrado em outros estudos, os gatos são a espécie-alvo de atos maliciosos de humanos pelo seu hábito de explorar o ambiente (SINCLAIR; LOCKWOOD, 2005; DE SIQUEIRA et al., 2012), o que os expõe a possíveis atos maliciosos, confirmados em nosso estudo com a combinação de intoxicação exógena e trauma (SINCLAIR; LOCKWOOD, 2005; MARLET; MAIORKA, 2010; DE SIQUEIRA et al., 2012). Outro fato é que a motivação para matar cães apresenta um aspecto diferente, porque estes animais também têm a função de guardar residências e empresas (MARLET; MAIORKA, 2010). Entretanto, com base nas informações obtidas nos Boletins de Ocorrência, há razões e, comum para matar cães e gatos, que podem estar relacionadas a violência doméstica, porque são considerados como membros da família (FELTHOUS, 1981; ARKOW, 1994; REICHENHEIM et al., 2006; ASCIONE; SHAPIRO, 2009; DEGUE; DILILLO, 2009). Além disso, de acordo com os dados de 2013 da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), há aproximadamente 37,1 milhões de cães e 21,3 milhões de gatos no Brasil, não contando com aqueles não domiciliados e que não são alimentados com ração. Estes números expressivos revelam a dimensão dos cuidados e do laço emocional que liga os animais de estimação e os seres humanos.

O mecanismo de toxicidade dos praguicidas carbamatos são bem conhecidos por inibir a enzima acetilcolinesterase, resultando na acumulação da acetilcolina nas fendas sinápticas (RISHER; MINK; STARA, 1987; BARON; MERRIAM, 1988; GUPTA, 1994). Os receptores muscarínicos são encontrados na superfície dos músculos lisos, no coração e nas glândulas exócrinas; os receptores nicotínicos são encontrados no sistema nervoso central e na superfície dos músculos esqueléticos. Portanto, a manifestação clínica da intoxicação pelos carbamatos, como êmese, diarreia, aumento da frequência de micção, broncorreia, bradicardia, miose são resultantes da hiperestimulação muscarínica; taquicardia, hipertensão, depressão respiratória, fasciculação muscular, fraqueza muscular e paralisia são resultantes da hiperestimulação nicotínica (RISHER; MINK; STARA, 1987; BARON; MERRIAM, 1988; GUPTA, 1994; ANASTASIO; SHARP, 2011). Algumas destas manifestações clínicas são relatadas por clínicos e proprietários, similar a estudos anteriores (FORRESTER; STANLEY, 2004; FLANAGAN; CONNALLY; EVANS, 2005; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; LEIBSON; LIFSHITZ, 2008; KHAN, 2012). Embora tais efeitos possam ser transitórios, dependem da dose ingerida e absorvida (ROTH et al., 1993; MORITZ et al., 1994), considerando que os metabólitos do aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, são inibidores potentes da enzima acetilcolinesterase (MONTESISSA et al., 1994).

Outro efeito tóxico dos carbamatos é o estresse oxidativo, porque os carbamatos catalisam a conversão do oxigênio a espécies reativa de oxigênio (ERO), como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e radicais hidroxila, o que pode ser prejudicial ao metabolismo celular, já que podem danificar proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, levando a morte celular (GUPTA; MILATOVIC; DETTBARN, 2001; MILATOVIC et al., 2001; GIORDANO, 2005; MARAN et al., 2009; OGUT et al., 2011). Estudos demonstraram que o carbofurano induziu a hiperatividade muscular em ratos, o que aumentou o óxido nítrico e os produtos da peroxidação lipídica, além de diminuir os níveis de ATP, o que leva ao estresse oxidativo (MILATOVIC; GUPTA; ASCHNER, 2006); resultados similares também foram encontrados no cérebro (GUPTA; MILATOVIC; DETTBARN, 2001; MILATOVIC; GUPTA; ASCHNER, 2006). Os inibidores de AChE também podem prejudicar a função endotelial, por serem tóxicos às células endoteliais (JUNG et al., 2003; YAVUZ et al., 2005) e à parede vascular (YAVUZ et al., 2005). Portanto, a congestão e a hemorragia, as lesões mais comuns encontradas em cães e gatos no

presente trabalho, similar a trabalhos anteriores (MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; PROENÇA et al., 2004; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; OTIENO et al., 2010; NOVOTNÝ et al., 2011), podem ser explicadas por uma combinação dos efeitos deletérios dos carbamatos, conforme segue: a hiperestimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos, que prejudica as funções cardíaca e respiratória, levando à hipóxia e consequente diminuição da produção de energia na mitocôndria e a disfunção endotelial pelo aumento dos ERO; a hiperestimulação dos receptores muscarínicos afeta o tônus vascular, a perfusão tecidual e a permeabilidade vascular.

Embora as lesões congestivas tivessem sido as mais frequentemente observadas nos cães e gatos tanto na macroscopia quanto na microscopia, um outro achado interessante foi a pancreatite necrosante aguda (WANG, 2009), que foi mais frequente em gatos do que em cães. Este achado corrobora estudos anteriores sobre intoxicações por carbamatos e organofosforados em humanos (MORITZ et al., 1994; RIZOS et al., 2004a; SINGH et al., 2007) e gatos (HILL; VAN WINKLE, 1993; XENOULIS; STEINER, 2008). Além disso, nestes estudos foram encontradas conexões entre pancreatite aguda hemorrágica necrosante e lesões pulmonares (LANKISCH; RAHLF; KOOP, 1983) o que pode ser uma explicação adicional ao edema e congestão pulmonares encontradas nos cães e gatos intoxicados. No caso dos gatos, também há uma particularidade anatômica no pâncreas, porque o ducto pancreático entra na papila duodenal maior, diferentemente dos cães, que também possuem um ducto acessório, inexistente nos gatos, e isto pode ter um papel no mecanismo de intoxicação pelos carbamatos (MANSFIELD; JONES, 2001).

Os raticidas anticoagulantes também devem ser considerados como um diagnóstico diferencial das intoxicações dos praguicidas carbamatos. As lesões mais comuns causadas pelos raticidas são hemorrágicas, com sangue livre nas cavidades torácica e abdominal (PETTERINO; PAOLO; TRISTO, 2004; WADDELL; POPPENG; DROBATZ, 2013; POESSEL et al., 2015), cerebelo (RUTOVIC et al., 2013), pulmão, fígado, vesícula urinária e traqueia (PETTERINO; PAOLO; TRISTO, 2004). Entretanto, em alguns casos, a hemorragia não é observada na necropsia, um indicativo de intoxicação por raticidas, e somente uma análise toxicológica poderia confirmá-la (SANCHEZ-BARBUDO; CAMARERO; MATEO, 2012). Nos casos em que foi observado sangue livre em cavidades no presente estudo, isso se deu devido a traumas e rupturas viscerais, e no exame histopatológico, a hemorragia

foi focal, diferentemente dos casos de intoxicação por raticidas, que é frequentemente multifocal (PETTERINO; PAOLO; TRISTO, 2004).

A análise histopatológica em casos de cunho forense é amplamente discutida e por vezes controversa. Em tais situações, é crucial a investigação da ocorrência de doenças pré-existentes, pois há condições que podem não apresentar características macroscópicas típicas ou marcantes, que podem ser encontradas no exame histopatológico (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; FIERRO, 2005; MOLINA; WOOD; FROST, 2007; CHATELAIN et al., 2012). Nos casos de intoxicação exógena, tanto a análise histopatológica quanto a toxicológica devem ser feitas, o que também é possível na exumação (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; KÄFERSTEIN et al., 2013). Há casos em que a polícia solicita que sejam utilizadas ferramentas diagnósticas auxiliares, porque isto fortalece a investigação criminal. Nossos achados estão de acordo com estudos anteriores, considerando que há animais que apresentaram algum grau de autólise ou mesmo a presença de larvas.

A análise toxicológica pelo CLAE-DAD revelou que todos os animais tiveram contato com os carbamatos, principalmente o aldicarbe, e em dois casos, uma mistura do aldicarbe com o carbofurano (HARPER; WEISSKOPF; COBB, 1998; OTIENO et al., 2010). A cromatografia em camada delgada pode ser utilizada como método de triagem para a intoxicação exógena por carbamatos (WANG et al., 2007; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007a; CAMPELO; CALDAS, 2010), conforme foi realizado no conteúdo gástrico dos animais intoxicados e, em estudos anteriores no nosso Departamento, foi encontrado aldicarbe no conteúdo gástrico pela cromatografia em camada delgada (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007a), e esta técnica apresenta limitações com relação a CLAE-DAD, já que a primeira só detecta o aldicarbe. Entretanto, utilizando-se o CLAE-DAD e outras matrizes biológicas, tais como o fígado, sangue e humor vítreo, pode-se identificar uma gama maior de substâncias além do aldicarbe, como seus metabólitos aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, e o carbofurano, o que pode fornecer mais informações a investigação. Quando uma destas substâncias é encontrada na matriz, é um indicativo de que teve contato com elas (HARPER; WEISSKOPF; COBB, 1998). Também houve casos nos quais foi detectada mais de uma substância no mesmo animal examinando-se diferentes matrizes, o que pode estar relacionada a sua estabilidade e à distribuição *post mortem* (RISHER; MINK; STARA, 1987; BARON; MERRIAM, 1988; AKCAN et al., 2009; CAMPELO; CALDAS, 2010; SKOPP, 2010;

DRUMMER et al., 2013). A substância mais frequentemente encontrada foi o aldicarbe sulfona, seguida pelo aldicarbe e pelo aldicarbe sulfóxido. Estas substâncias são comumente encontradas em outras matrizes, mas não há dados que correlacionem tal frequência e as condições de conservação do cadáver. Os presentes achados podem indicar que o metabólito aldicarbe sulfona pode ser mais frequente em cadáveres que não foram submetidos a qualquer tipo de conservação. Entretanto, deve-se ter em mente que pode haver algum grau de metabolismo e de distribuição *post mortem* dos praguicidas (DE ZEEUW, 2004; FLANAGAN; CONNALLY; EVANS, 2005; AKCAN et al., 2009; BUTZBACH, 2010), mas mesmo isso não descarta a hipótese de que o animal teve algum contato com as substâncias estudadas.

O papel da patologia veterinária forense é fornecer evidências confiáveis à investigação criminal (MUNRO, 1998; FIERRO, 2005; COOPER; COOPER, 2008; DE SIQUEIRA et al., 2012; MILLS, 2013; PETERSON et al., 2013). A observação acurada e a descrição correta das lesões, além de um registro fotográfico consistente, bem como o registro, a coleta e a conservação corretos das amostras pode garantir que os resultados sejam fidedignos (MUNRO, 1998). A investigação de crimes contra animais é desafiadora e demanda o mesmo tipo de conduta do que esses tipos de casos em humanos (SINCLAIR; LOCKWOOD, 2005; SINCLAIR; MERCK; LOCKWOOD, 2006; COOPER; COOPER, 2008; MARLET; MAIORKA, 2010; NEWBERY; MUNRO, 2011; MERCK, 2012b).

2.5 CONCLUSÃO

As análises macroscópica e microscópica, bem como a avaliação toxicológica, demonstraram que só o aldicarbe ou em associação com seus metabólitos, e o carbofurano, podem causar lesões sistêmicas, resultantes de uma interação complexas entre seus efeitos tóxicos. Além disso, as ferramentas diagnósticas auxiliares devem ser utilizadas sempre que possível, pois são cruciais para contribuir à solução de um crime, mesmo em casos nos quais o cadáver apresente condições ruins de conservação. A intoxicação intencional de animais é um crime cruel, e uma

investigação criminal deve ser feita baseada em evidências confiáveis, as quais são fornecidas por patologistas veterinários e toxicologistas, e podem ser fundamentais para a solução dos crimes.

3 A INTOXICAÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR PELOS CARBAMATOS ALDICARBE E CARBOFURANO INDUZ LESÕES HISTOLÓGICAS, ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, HEMATOLÓGICAS E PRODUZ SÍNDROME COLINÉRGICA

3.1 INTRODUÇÃO

Os carbamatos aldicarbe (2-metil-2-[metiltio]propionaldeído-O-[metilcarbamil]oxima) e carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metilcarbamato) são amplamente utilizados na agricultura no mundo todo (BARON; MERRIAM, 1988; GUPTA, 1994; GAMMON; LIU; BECKER, 2012). Essas substâncias e seus metabólitos são potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase e são altamente tóxicas (FERGUSON et al., 1984; BARON, 1994; GUPTA, 1994; MONTESISSA et al., 1994; GUPTA; MILATOVIC; DETTBARN, 2001; MILATOVIC; GUPTA; ASCHNER, 2006), o que produz efeitos tóxicos tanto nas espécies alvo (VAN GESTEL, 1992; HERBRANDSON; BRADBURY; SWACKHAMER, 2003; SAXENA; GUPTA; MURTHY, 2014) quanto nas espécies não alvo (RISHER; MINK; STARA, 1987; GRENDON; FROST; BAUM, 1994; FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; FLEISCHLI et al., 2004; WANG et al., 2007; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; OTIENO et al., 2010; ANASTASIO; SHARP, 2011; NOVOTNÝ et al., 2011). Além disso, há utilização errônea destas substâncias como raticidas, o que pode culminar na intoxicação acidental, já que os carbamatos aldicarbe e carbofurano têm uso preconizado somente na agricultura (LIMA; REIS, 1995; NELSON et al., 2001; BUCARETCHI et al., 2012).

Atualmente ainda há casos de intoxicação exógena com caráter intencional em pessoas, como em situações de homicídios e suicídios (LIMA; REIS, 1995; COVACI et al., 1999; NELSON et al., 2001; NISSE et al., 2002; PROENÇA et al., 2004; RIZOS et al., 2004a; CAMPELO; CALDAS, 2010; REBELO et al., 2011; ZHOU et al., 2011; BUCARETCHI et al., 2012), e em animais (MONTESISSA et al., 1994; FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; FORRESTER; STANLEY, 2004; WANG et al., 2007; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; ANASTASIO; SHARP, 2011; ARNOT et al., 2011; NOVOTNÝ et al., 2011; DE SIQUEIRA et al., 2012). Nestes casos, geralmente os praguicidas são administrados por via oral em alta

dose, que pode ser variável, misturadas a alimentos palatáveis (FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; ARNOT et al., 2011), o que facilita a sua ingestão e mascara o seu gosto. Nesta situação, os efeitos teciduais mais comumente encontrados são congestão e hemorragia sistêmicos, com edema pulmonar (SAADEH; FARSAKH; AL-ALI, 1997; RIZOS et al., 2004a; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; GIADINIS et al., 2009; KARAMI-MOHAJERI; ABDOLLAHI, 2011; NOVOTNÝ et al., 2011), embora haja estudos que afirmam que tais achados não são possíveis de serem encontrados pelo caráter agudo deste tipo de intoxicação (FRAZIER et al., 1999). Com relação aos parâmetros hematológicos e bioquímicos, estes comumente são referenciados em estudos de intoxicação experimental crônica e subcrônica (BARON, 1994; GUPTA, 1994; DIAS et al., 2014; HARABAWY; IBRAHIM, 2014), nos quais são encontradas alterações significativas. Além disso, há estudos que descrevem os efeitos imunotóxicos dos carbamatos em humanos e em camundongos (VOS; KRAJNC, 1983; RODGERS, 1995; BANERJEE; KONER; RAY, 1996; VOCCIA et al., 1999).

Como os carbamatos atuam nos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos, os sinais clínicos frequentemente observados são agrupados na chamada síndrome ou crise colinérgica (GUPTA, 1994; COVACI et al., 1999; SINGH et al., 2007; HOFFMANN; HECKER; ABEL, 2008; INDIRA; ANDREWS; RAKESH, 2013). Os receptores muscarínicos são encontrados no músculo liso, no coração e nas glândulas exócrinas, e sua estimulação gera alterações respiratórias, tais como broncorreia, bradipnéia devido a broncoconstrição, sialorreia, lacrimejamento e sudorese, náusea, vômito, diarreia, aumento da micção. Os receptores nicotínicos estão localizados principalmente no sistema nervoso central, nas terminações nervosas neuromotoras e nos gânglios autonômicos, e sua estimulação gera efeitos nos músculos esqueléticos, como fadiga, fraqueza, tremores involuntários, e também afeta os músculos respiratórios, o que contribui à dispneia e cianose, com parada respiratória, esta última tanto devido aos efeitos diretos nos pulmões quanto no tronco cerebral (BONHAM, 1995; BURTON; KAZEMI, 2000; MARRS; MAYNARD, 2013). Além disso, ocorre agitação, acompanhada por depressão e coma (RISHER; MINK; STARA, 1987; BARON, 1994; GUPTA, 1994; FRAZIER et al., 1999; NELSON et al., 2001; YAVUZ et al., 2005; LEIBSON; LIFSHITZ, 2008; GIADINIS et al., 2009; ANASTASIO; SHARP, 2011; ARNOT et al., 2011; KARAMI-MOHAJERI; ABDOLLAHI, 2011).

O sangue é uma das matrizes mais utilizadas nas análises toxicológicas nos casos de intoxicação por praguicidas em humanos (FERSLEW; HAGARDORN; MCCORMICK, 1992; AMENO et al., 2001; YAVUZ et al., 2005; HOFFMANN; HECKER; ABEL, 2008; SAKUNTHALA TENNAKOON; KARUNARATHNA; UDUGAMPALA, 2013; DEARMOND et al., 2015) em cães (MELITO; FLORIO, 2006) e em animais de laboratório (FERGUSON et al., 1984; PELEKIS; EMOND, 2009; DIAS et al., 2014). Deste modo, para a avaliação experimental dos efeitos tóxicos dos praguicidas, com doses crônicas e subagudas, usualmente se utiliza o rato (*Rattus norvegicus*) (FERGUSON et al., 1984; GUPTA; MILATOVIC; DETTBARN, 2001; MILATOVIC et al., 2005; BRKIC et al., 2008; PELEKIS; EMOND, 2009; RAI et al., 2009; DIAS et al., 2014), com estudos demonstrando que tais resultados são extrapoláveis a humanos (PELEKIS; EMOND, 2009), o que enfatiza e corrobora a importância destes trabalhos.

Os objetivos deste trabalho são mostrar que ocorrem lesões histológicas na intoxicação aguda pelos carbamatos aldicarbe e carbofurano, as alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, e os sinais clínicos decorrentes da intoxicação aguda em curto intervalo de tempo, mimetizando o que ocorre com cães e gatos maliciosamente intoxicados¹ (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c), bem como detectar os carbamatos no sangue pelo cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodos (CLAE-DAD). Além disso, será feita a comparação das alterações e lesões causadas pelos dois carbamatos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, de aproximadamente 300 gramas, com 70 dias, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP.

¹ SIQUEIRA, A.; FUKUSHIMA, A.R.; SALVAGNI, F.A.; YOSHIDA, A.S.; SPINOSA, H.S.; MAIORKA, P.C. Poisoning of cats and dogs by the carbamate pesticides aldicarb and carbofuran. Trabalho submetido e em fase de revisão.

Foram alocados 5 animais por caixa em ambiente climatizado, à temperatura aproximada entre 24 a 26°C e umidade relativa do ar entre 60 e 70%, com luminosidade artificial, em um ciclo de claro-escuro de 12 horas. O acesso a água e ração foi *ad libitum*. Os animais eram ambientados a estas condições cerca de 10 dias antes de sua utilização. Todos os procedimentos experimentais, bem como a condição de acondicionamento dos animais, foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-FMVZ-USP), e recebeu o protocolo de número 2301/2011.

3.2.2 Preparação das soluções de aldicarbe e de carbofurano

Para simular os efeitos da dose letal dos carbamatos aldicarbe e carbofurano geralmente ministrada aos animais intoxicados, cuja dose geralmente é desconhecida, a preparação das soluções aquosas se deu de forma a atingir uma alta dose, já que a DL_{50} do aldicarbe é de 0,5-1,5 mg/kg para os ratos, e a do carbofurano varia de 5-13 mg/kg à mesma espécie. Deste modo, foi preparada uma solução de 50mL com 1 g de grânulos, a partir do grânulo de Temik®, que contém 15% de aldicarbe, de modo a atingir a concentração de 3,0 mg/mL. Foi preparada uma solução de 50mL com 4 g de grânulos de Furadan®, que contém 5% de carbofurano, para atingir a concentração de 4,0 mg/mL.

3.2.3 Protocolo experimental

Foi fornecido 1,5 mL de solução aquosa de aldicarbe por gavagem oral, na concentração de 3,0 mg/mL, por rato ($n = 10$ animais) e 2,0 mL de solução aquosa de carbofurano, na concentração de 4,0 mg/mL, por rato ($n = 10$ animais). Ambas as substâncias foram administradas em dose única. Os animais controles receberam por gavagem 2,0 mL de água ($n = 10$ animais).

3.2.4 Observação e avaliação dos sinais clínicos

Tanto após a administração da solução de aldicarbe quanto a de carbofurano, os animais foram colocados em uma caixa com maravalha acoplada a uma estativa, para avaliar os sinais clínicos e o tempo em que ocorreram, e foi realizada a filmagem por 5 minutos com a máquina fotográfica digital Canon Powershot SX130 IS. O mesmo foi realizado com o grupo controle.

Após os animais começaram a apresentar os sinais da síndrome da síndrome colinérgica, tais como aumento da micção, agitação, fasciculações musculares, torpor e coma, foi feita a sedação profunda com uma solução de quetamina (Dopalen 10%, Ceva, 0,3 mL/animal) e xilazina (Anasedan 2%, Vetbrands, 0,2 mL/animal).

3.2.5 Coleta de sangue e eutanásia

Após o avaliar a sensibilidade a dor, quando não houve nenhuma reação aos testes de sensibilidade, foi feita a colheita via punção cardíaca, cujo volume médio colhido foi de 8 mL, para a realização do exame toxicológico, do hemograma e da bioquímica sérica para avaliar a alanina transaminase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia, ácido úrico, creatinina, proteína total, albumina e globulina, além da colinesterase. Foi colhido sangue em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a realização do hemograma, e em tubo seco para a realização do exame toxicológico e à bioquímica sérica.

3.2.6 Necropsia e colheita de material biológico

A necropsia foi realizada imediatamente após o óbito. O cérebro, o pulmão, o estômago cheio e vazio, fígado, rim e adrenais foram avaliados, retirados, fotografados e pesados. Foram colhidos três fragmentos de cada órgão, de porções

aleatórias. O cérebro foi colhido inteiro e cortado em 6 partes, adaptado de (RAO et al., 2011), que depois foram agrupadas em C1 (lobo frontal a hipocampo) e em C2 (hipocampo a tronco encefálico). Todos os tecidos foram fixados em formalina a 10% tamponada, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 5µm foram corados pela hematoxilina e eosina. As lâminas foram revisadas pelos autores. O escore lesional microscópico foi utilizado para avaliação, de acordo com a sua distribuição, conforme segue: 0 – sem lesões; 1 –focal; 2 –multifocal a coalescente; 3 –difusa.

3.2.7 Análise toxicológica

3.2.7.1 Extração líquido-líquido

Os melhores índices de recuperação dos carbamatos e metabólitos em matrizes biológicas foram obtidos conforme os seguintes procedimentos: 1) foram utilizados 4 mL de sangue, ao qual foi adicionado o padrão interno; 2) foi adicionado na proporção de 1:1 uma mistura de éter:clorofórmio; 3) Foi realizada a agitação por 60 minutos em agitador tipo vortex automático; 4) após a agitação foi realizada uma centrifugação a 4000 rpm sobre uma temperatura de 4°C por 3 minutos; 5) a porção etérea foi separada e filtrada através de sulfato de sódio anidro; 6) o resíduo da filtração foi evaporado em capela a temperatura ambiente e o mesmo foi reconstituído com acetonitrila a qual foi filtrada em filtros de poros de 0,22 µm, e esse extrato foi injetado no cromatógrafo e analisado pela CLAE-DAD (Agilent 1100, Agilent Technologies).

3.2.7.2 Método de análise por CLAE-DAD

As condições ótimas de separação e análise dos carbamatos e metabólitos foram obtidas utilizando-se fluxo de 1,0 mL/min no modo de eluição gradiente com programação linear, iniciando com 100% de água e 0% de acetonitrila (ACN) até

80% de ACN/H₂O em 30 min; temperatura da coluna selecionada em 30 °C; volume de injeção 20 µL e detector de arranjo de diodos, selecionado para detecção simultânea nos seguintes comprimentos de onda: 203 e 246. O comprimento de onda de absorção para aldicarbe foi 246 nm; para 3-hidroxicarbofurano, aldicarbe sulfóxido, aldicarbe sulfona, carbofurano e metiocarbe em 203 nm. Nestas condições, os carbamatos e seus metabólitos foram analisados em uma corrida cromatográfica de 60 minutos. Após cada análise a coluna foi limpa com 50% de ACN/H₂O até 100% de ACN em 5 minutos. O retorno às condições iniciais para nova análise foi de 100% de ACN até 100% de água. A coluna foi mantida nas condições iniciais de análise por 10 minutos antes de nova injeção para estabilização. Os padrões analíticos utilizados foram aldicarb Pestanal (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), aldicarb sulfona Pestanal (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), aldicarb sulfóxido Pestanal (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), carbofurano (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e carbofurano-3-hidroxi Pestanal (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

3.2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software R, versão 3.1.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Os dados paramétricos foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey HSD (*honest significant differences*)². Os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste Kurskal-Wallis com múltiplas comparações entre os grupos. As diferenças foram consideradas significantes para $p \leq 0,05$.

² Teste estatístico: Tukey's honest significant differences post hoc analysis.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Sinais clínicos da intoxicação experimental

Os animais experimentalmente intoxicados por aldicarbe e por carbofurano apresentaram sinais clínicos semelhantes. Com relação ao aldicarbe, as médias de tempo para o surgimentos de sinais clínicos, medidas em minutos, os animais começaram a apresentar agitação, taquipnéia e espasmos musculares com 1 minuto e 30 segundos, prostração e paralisia com 1 minuto e 50 segundos, e com três minutos e 30 segundos apresentaram espasmos corporais e ataxia acentuados. Além disso, em dois animais foi possível observar sialorreia intensa, em 5 animais houve hemorragia ocular e um animal vocalizou. Com relação ao carbofurano, os animais começaram a apresentar agitação e taquipnéia aos 2 minutos, e foi evidente a dor abdominal, demonstrada pela contração intensa aos 2 minutos e 22 segundos, com espasmos corporais leves e ataxia aos 3 minutos e 3 segundos. Dois animais apresentaram sialorreia, 1 vocalizou e 3 apresentaram aumento da frequência de defecação.

3.3.2 Análise histopatológica

As figuras 3 a 6 representam as imagens dos tecidos dos animais experimentalmente intoxicados pelos praguicidas carbamatos aldicarbe e carbofurano.

Figura 3 – Fotomicrografias do cérebro, pâncreas e estômago no *post mortem* imediato dos ratos Wistar intoxicados experimentalmente com aldicarbe (3,0 mg/mL)

Legenda: Fotomicrografias do cérebro, coração, pâncreas e estômago no *post mortem* imediato dos ratos Wistar; **A:** cerebelo, meninge: hemorragia e congestão de meninge, aumento de 100x; **B:** cérebro: congestão e edema perivascular e perineuronal, aumento de 100x; **C:** pâncreas: congestão e hemorragia, aumento de 100x; **D:** estômago: hemorragia em submucosa, aumento de 200x. **E:** estômago: congestão em mucosa e em submucosa, aumento de 200x. Barra = 50µm.

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 4 – Fotomicrografias do pulmão, rim, fígado e glândula adrenal no *post mortem* imediato dos ratos Wistar intoxicados experimentalmente com aldicarbe (3,0 mg/mL)

Legenda: Fotomicrografias do pulmão, rim, fígado e glândula adrenal no *post mortem* imediato dos ratos Wistar; **F:** pulmão: congestão e hemorragia, aumento de 200x; **G:** pulmão: congestão e enfisema, aumento de 100x; **H:** rim: congestão e nefrose, aumento de 200x; **I:** fígado: congestão e degeneração hidrópica, aumento de 400x; **J:** glândula adrenal: congestão em córtex, congestão e hemorragia medula, aumento de 200x. Barra = 50µm.
 Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 5 – Fotomicrografias do cérebro, pâncreas e estômago no *post mortem* imediato dos ratos Wistar intoxicados experimentalmente com carbofurano (4,0 mg/mL)

Legenda: Fotomicrografias do cérebro, coração, pâncreas e estômago no *post mortem* imediato dos ratos Wistar; **A**: cérebro: congestão e edema perivascular e perineuronal, aumento de 100x; **B**: cérebro: hemorragia, aumento de 400x; **C**: pâncreas: congestão, aumento de 200x; **D**: estômago: congestão em mucosa e em submucosa, aumento de 200x. Barra = 50µm.
Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 6 – Fotomicrografias do pulmão, fígado, rim e glândula adrenal no *post mortem* imediato dos ratos Wistar intoxicados experimentalmente com carbofurano (4,0 mg/mL)

Legenda: Fotomicrografias do pulmão, fígado, rim e glândula adrenal no *post mortem* imediato dos ratos Wistar; **E**: pulmão: congestão, hemorragia e edema (seta), aumento de 100x; **F**: pulmão: congestão e enfisema, aumento de 100x; **G**: fígado: congestão e hemorragia, aumento de 100x; **H**: fígado: congestão, aumento de 400x; **I**: rim: congestão e nefrose, aumento de 200x; **J**: glândula adrenal: congestão em medula, aumento de 200x. Barra = 50µm.

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

3.3.2 Análise estatística

3.3.2.1 Alterações histopatológicas

Nas figuras 7 a 14 constam as análises estatísticas relativas às alterações histopatológicas observadas entre os animais experimentalmente intoxicados por aldicarbe, carbofurano e o grupo controle.

Figura 7 - Escore microscópico da glândula adrenal dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação ao grupo controle

Legenda: As barras representam a mediana, com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos da adrenal (n = 10/grupo). A – Congestão da medula da adrenal (P = 0,0006, Teste de Kruskal-Wallis). B – Congestão do córtex da adrenal (P = 0,0149, Teste de Kruskal-Wallis). C – Hemorragia da adrenal (P = 0,0041, Teste de Kruskal-Wallis). D – Reatividade do córtex da adrenal (P = 0,1046, Teste de Kruskal-Wallis). Letras diferentes sobre as caixas indicam diferenças estatísticas significantes, em P < 0,05 (Teste de Tukey-Kramer).

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 8 - Escore microscópico do estômago dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação ao grupo controle

Legenda: As barras representam a mediana, com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do estômago (n = 10/grupo). A – Congestão da mucosa do estômago (P = 0,0637, Teste de Kruskal-Wallis). B – Congestão da submucosa do estômago (P = 0,0065, Teste de Kruskal-Wallis). C – Hemorragia do estômago (P = 0,3679, Teste de Kruskal-Wallis). Pontos pretos representam os valores de escores brutos. Letras diferentes sobre as caixas indicam diferenças estatísticas significantes, em P < 0,05 (Teste de Tukey-Kramer).

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 9 - Escore microscópico do cérebro/meninge (1) dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação ao grupo controle

Legenda: As barras representam a mediana, com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do cérebro e meninge (1*) (n = 10/grupo). A – Congestão do cérebro (P = 0,0001, Teste de Kruskal-Wallis). B – Edema do cérebro (P = 0,0010, Teste de Kruskal-Wallis). C – Hemorragia no cérebro (P = 0,0435, Teste de Kruskal-Wallis). D – Congestão em paquimeninge (P = 0,0385, Teste de Kruskal-Wallis). E – Hemorragia em paquimeninge (P = 0,0047, Teste de Kruskal-Wallis). Pontos pretos representam os valores de escores brutos. Letras diferentes sobre as caixas indicam diferenças estatísticas significantes, em P < 0,05 (Teste de Tukey-Kramer).
Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 10 - Escore microscópico do cérebro/meninge (2) dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação ao grupo controle

Legenda: As barras representam a mediana, com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do cérebro e meninge (2*) (n = 10/grupo A – Congestão do cérebro (P = 0,0086, Teste de Kruskal-Wallis). B – Edema do cérebro (P = 0,0153, Teste de Kruskal-Wallis). C – Hemorragia no cérebro (P = 0,0041, Teste de Kruskal-Wallis). D – Congestão em paquimeninge (P = 0,0004, Teste de Kruskal-Wallis). E – Hemorragia em paquimeninge (P = 0,0373, Teste de Kruskal-Wallis). Pontos pretos representam os valores de escores brutos. Letras diferentes sobre as caixas indicam diferenças estatísticas significantes, em P < 0,05 (Teste de Tukey-Kramer).
Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 11 - Escore microscópico do fígado dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação ao grupo controle

Legenda: As barras representam a mediana, com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do fígado (n = 10/grupo). A – Congestão do fígado (P = 0,0001, Teste de Kruskal-Wallis). B – Hemorragia do fígado (P = 0,0091, Teste de Kruskal-Wallis). C – Degeneração hidrópica do fígado (P = 0,0041, Teste de Kruskal-Wallis). D – Degeneração microgútular do fígado (P = 0,3435, Teste de Kruskal-Wallis). Letras diferentes sobre as caixas indicam diferenças estatísticas significantes, em P < 0,05 (Teste de Tukey-Kramer). Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 12 - Escore microscópico do pâncreas dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação ao grupo controle

Legenda: As barras representam a mediana, com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do pâncreas (n = 10/grupo). A – Congestão do pâncreas (P = 0,0012, Teste de Kruskal-Wallis). B – Hemorragia do pâncreas (P = 0,2042, Teste de Kruskal-Wallis). Letras diferentes sobre as caixas indicam diferenças estatísticas significantes, em P < 0,05 (Teste de Tukey-Kramer).
 Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 13 - Escore microscópico do pulmão dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação ao grupo controle

Legenda: As barras representam a mediana, com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do pulmão (n = 10/grupo). A – Edema do pulmão (P = 0,00009, Teste de Kruskal-Wallis). B – Congestão do pulmão (P = 0,00009, Teste de Kruskal-Wallis). C – Hemorragia do pulmão (P = 0,0014, Teste de Kruskal-Wallis). D – Enfisema do pulmão (P = 0,0003, Teste de Kruskal-Wallis). Letras diferentes sobre as caixas indicam diferenças estatísticas significantes, em P < 0,05 (Teste de Tukey-Kramer).
Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 14 - Escore microscópico do rim dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação ao grupo controle

Legenda: As barras representam a mediana, com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do rim ($n = 10/\text{grupo}$). A – Congestão do rim ($P = 0,00006$, Teste de Kruskal-Wallis). B – Hemorragia do rim ($P = 0,00005$, Teste de Kruskal-Wallis). C – Nefrose ($P = 0,00002$, Teste de Kruskal-Wallis). Letras diferentes sobre as caixas indicam diferenças estatísticas significantes, em $P < 0,05$ (Teste de Tukey-Kramer).

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

3.2.3.2 Hematologia e bioquímica sérica

Nas tabelas 5 e 6 estão descritas as alterações em hemograma e bioquímica sérica dos animais experimentalmente intoxicados por aldicarbe e por carbofurano, com relação ao grupo controle.

Tabela 5 – Hemograma (contagem e diferencial) dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação com animais do grupo controle

	Controle* (n=10)	Aldicarbe (n=10)	Carbofurano (n=10)
Eritrócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6,6 ^a ±0,3	7,5 ^b ±0,4b	7,2 ^b ±0,5
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,2 ^a ±1,4	7,2 ^a ±1,5	4,9 ^b ±1,8
Hemoglobina (g/dL)	14,7 ^c ±1,0	16,8 ^a ±0,8	15,8 ^b ±0,9
Hematócrito (%)	39,2 ^b ±1,7	44,2 ^a ±1,9	42,6 ^a ±3,2
MCHC (g/dL)	22,1 ^a ±0,6	22,3 ^a ±0,9	21,9 ^a ±0,4
MCH (pg)	37,4 ^a ±1,0	37,9 ^a ±0,6	37,0 ^a ±1,1
MCV (μm^3)	59,1 ^a ±0,8	58,8 ^a ±1,6	59,2 ^a ±2,3
Segmentados (mm^3)	877,7 ^a ±382,2	920,0 ^a ±377,1	586,0 ^a ±170,5
Bastonetes (mm^3)	9,4 ^a ±29,7	22,4 ^a ±51,6	9,9 ^a ±21,9
Eosinófilos (mm^3)	29,3 ^a ±38,9	78,1 ^b ±42,0	19,2 ^a ±34,2
Linfócitos (mm^3)	5943,7 ^a ±1100,8	5859,3 ^a ±1288,9	4287,2 ^b ±1750,7
Monócitos (mm^3)	304,3 ^a ±118,5	350,2 ^a ±143,8	62,1 ^b ±81,8
Basófilos (mm^3)	14,0 ^a ±29,65	0,0 ^a ± 0,0	5,6 ^a ±12,26

Nota: os dados representam a média ±desvio padrão; letras diferentes entre os grupos representam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$); Teste de ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey-Kramer para comparações entre grupos (n=10 animais/grupo).

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Tabela 6 – Bioquímica sérica e colinesterase dos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação com animais do grupo controle

	Controle* (n=10)	Aldicarbe (n=10)	Carbofurano (n=10)
Ácido úrico (mg/dL)	2,3 ^a ±0,86	3,77 ^{a,b} ±2,37	6,26 ^b ±3,3843
Alanina aminotransferase (U/L)	51,8 ^a ±10,84	68,6 ^b ±6,65	63,3 ^{a,b} ±15,621
Aspartato aminotransferase (U/L)	200,4 ^a ±34,05	200,4 ^a ±63,94	218,0 ^a ±45,9001
Colesterol total (mg/dL)	82,1 ^a ±24,16	71,4 ^a ±6,70	106,0 ^b ±18,10
Creatinina (mg/dL)	0,83 ^a ±0,09	0,87 ^a ±0,11	1,27 ^b ±0,08

(continua)

			(conclusão)
Fosfatase alcalina (U/L)	294,2 ^a ±50,24	323,3 ^{a,b} ±59,31	371,6 ^b ±73,01
Glicose (mg/dL)	192,4 ^{a,b} ±43,77	180,5 ^a ±35,57	249,3 ^b ±40,66
Proteína total (g/dL)	5,41 ^a ±0,51	6,07 ^b ±0,52	5,49 ^a ±0,16
Albumina (g/dL)	3,83 ^a ±0,30	4,38 ^b ±0,10	3,87 ^a ±0,24
Globulina (g/dL)	1,58 ^a ±0,76	1,11 ^a ±0,13	2,20 ^b ±0,41
Triglicérides (mg/dL)	249,11 ^a ±91,74	304,1 ^a ±197,33	287,7 ^a ±80,72
Ureia (mg/dL)	57,3 ^a ±6,25	60,5 ^a ±5,36	58,1 ^a ±4,46

Nota: os dados representam a média ±desvio padrão; letras diferentes entre os grupos representam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$); Teste de ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey-Kramer para comparações entre grupos ($n=10$ animais/grupo).
Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

3.2.3.3 Concentração sérica de acetilcolinesterase

Na Figura 15 estão ilustradas as concentrações séricas de acetilcolinesterase no três grupos.

Figura 15 – Concentração sérica da enzima acetilcolinesterase nos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL) em comparação ao grupo controle

Legenda: Os resultados representam média ± desvio padrão das concentrações da enzima acetilcolinesterase ($n = 10$ /grupo). Os grupos representam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$). Teste de ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey-Kramer para comparações entre grupos ($n=10$ animais/grupo).
Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

3.2.3.4 Quantificações de aldicarbe e de carbofurano no sangue

Na tabela 7 estão elencadas as concentrações sanguíneas de aldicarbe e carbofurano nos animais intoxicados, representados pela sua média e desvios-padrão.

Tabela 7 – Concentração sanguínea ($\mu\text{g/mL}$) de aldicarbe e de carbofurano nos ratos Wistar intoxicados por aldicarbe (3,0mg/mL), por carbofurano (4mg/mL)

Substância	Concentração média $\pm$ desvio padrão	Concentração máxima	Concentração mínima
Aldicarbe	3,548917 $\pm$ 2.28518031	8.125378944	1.017724604
Carbofurano	7,997846 $\pm$ 9.8762599	37.13471997*	2.348367226

Nota: *esvaziamento gástrico

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

3.3 DISCUSSÃO

Os sinais clínicos observados nos animais experimentais foram muito semelhantes aos relatados em outros estudos, nos quais são relatados sinais clínicos advindos da síndrome colinérgica (BARON, 1994; LIMA; REIS, 1995; NELSON et al., 2001; HOFFMANN; HECKER; ABEL, 2008; LEIBSON; LIFSHITZ, 2008; GIADINIS et al., 2009; ANASTASIO; SHARP, 2011; ARNOT et al., 2011; BUCARETCHI et al., 2012), que em sua maioria foram intoxicações intencionais, nas quais os praguicidas foram fornecidos ou ingeridos em dose única. Há relatos de que o surgimento dos sinais clínicos varia de 30 minutos a 3 horas em cães e gatos (FRAZIER et al., 1999; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007a; ANASTASIO; SHARP, 2011; ARNOT et al., 2011), entretanto a dose é desconhecida. No caso de nosso estudo, a alta dose gerou a síndrome colinérgica em menos de 10 minutos, o que sugere que, dependendo da dose, os efeitos podem ocorrer de modo mais rápido e intenso (ROTH et al., 1993; MORITZ et al., 1994). No caso do aldicarbe, semelhante a outro estudo em ratos, também foram observados tremores e ataxia (MOSER, 1999). Além disso, a concentração sérica de colinesterase nos animais intoxicados com aldicarbe estava drasticamente diminuída com relação ao carbofurano e ambos com relação ao controle, o que é o esperado devido a toxicidade das substâncias (FERGUSON et al., 1984; GUPTA, 1994; MILATOVIC; GUPTA; ASCHNER, 2006;

SINGH et al., 2007; HOFFMANN; HECKER; ABEL, 2008; MARRS; MAYNARD, 2013; DIAS et al., 2014), o que explica os sinais clínicos, pois uma dose alta e única pode não possibilitar à enzima acetilcolinesterase que retome sua atividade e reverta os efeitos dos carbamatos (ROTH et al., 1993). Isto também pode, em parte, explicar as lesões histológicas, já que houve lesões em todos os órgãos avaliados, como congestão e hemorragia de escore variado, o que corrobora com outros estudos (SHERMAN; ROSS, 1969; GUPTA, 1994; MORITZ et al., 1994; SINGH; SINGH; SHARMA, 2003; RIZOS et al., 2004a; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c), embora haja estudos que afirmem que as intoxicações agudas por carbamatos não provocam lesões, sejam elas macroscópicas ou histológicas (FRAZIER et al., 1999).

A utilização de um sistema de escore lesional auxilia na uniformização da avaliação de lesões, o que pode ser imprescindível na sua interpretação (GIBSON-CORLEY; OLIVIER; MEYERHOLZ, 2013), revelando que, embora os praguicidas aldicarbe e carbofurano sejam ambos da classe dos carbamatos, eles provocam lesões com distribuição diferentes. Isso pode ser explicado pela distribuição e tipo de receptor colinérgico nas vísceras (EDVINSSON; FALCK; OWMAN, 1977; RISHER; MINK; STARA, 1987; RAMACHANDRAN et al., 1989; KALARIA; HOMAYOUN; WHITEHOUSE, 1994; TRAISH et al., 1995; MILATOVIC; GUPTA; ASCHNER, 2006; MARRS; MAYNARD, 2013). Ao avaliar o cérebro dos ratos em porções diferentes, pode-se verificar que as lesões de maior escore ocorrem na porção do hipotálamo ao tronco encefálico, o que pode ser explicado pela distribuição dos receptores nicotínicos e muscarínicos no sistema nervoso central, que não é homogênea, bem como a atividade da enzima acetilcolinesterase (EDVINSSON; FALCK; OWMAN, 1977; ESTRADA; KRAUSE, 1982; KALARIA; HOMAYOUN; WHITEHOUSE, 1994; ELHUSSEINY et al., 1999; MOSER, 1999; JUNG et al., 2003). Os achados na glândula adrenal também podem ter explicação semelhante, já que a inervação do cortex e da medula são diferentes, bem como a presença de receptores nicotínicos e muscarínicos e seus tipos celulares, o que culminou em lesões multifocais com maior escore na medula (KESSE; PARKER; COUPLAND, 1988; COUPLAND et al., 1989; KOKO et al., 2004), cujas células apresentaram vacuolização focal tanto no aldicarbe quanto no carbofurano. O fígado, órgão de metabolismo dos carbamatos aldicarbe e carbofurano quando ingeridos por via oral, apresentou distribuição multifocal da congestão e focal para a degeneração hidrópica, demonstrando que, mesmo em curto tempo, as praguicidas são capazes de causar alterações celulares,

o que também ocorre no rim (GIADINIS et al., 2009; PELEKIS; EMOND, 2009; KARAMI-MOHAJERI; ABDOLLAHI, 2011; SAKUNTHALA TENNAKOON; KARUNARATHNA; UDUGAMPALA, 2013; DIAS et al., 2014; IBRAHIM; HARABAWY, 2014).

A bioquímica sérica, juntamente com as lesões teciduais, são parâmetros importantes para a avaliação das lesões celulares causadas pelos carbamatos, embora sejam mais utilizadas em estudos de intoxicação crônica, ou em que as doses são seriadas (BARON, 1994; GUPTA, 1994; MOSER, 1999; SINGH; SINGH; SHARMA, 2003; MUDIAM; CH; SAXENA, 2013; DIAS et al., 2014; HARABAWY; IBRAHIM, 2014). Entretanto, encontrou-se diferenças significantes na alanina transaminase (ALT), proteína total, fosfatase alcalina, creatinina, glicose, colesterol e ácido úrico, cuja concentração foi diferente entre os grupos, sugerindo lesão hepática e renal e revelando que o aldicarbe e o carbofurano apresentam mecanismo de toxicidade celular diferenciada (BRKIC et al., 2008; SATPAL; JAIN; PUNIA, 2010; DIAS et al., 2014), além de serem possíveis indicativos, juntamente com a acetilcolinesterase e com os sinais clínicos da síndrome colinesterásica, de intoxicação por carbamatos. Outro fato é que a glicose pode ser um indicativo de estresse em ratos, tanto por manuseio quanto por procedimentos experimentais (GARTNER et al., 1980; PASCOE; SMYTHE; STORLIEN, 1991; LEE, 1992). Entretanto, verifica-se um maior aumento da sua concentração no grupo do carbofurano, o que pode ser explicado pelo odor aversivo da substância. Os parâmetros hematológicos podem refletir o status imune do animal, bem como sua reação a agentes tóxicos, conforme foi observado com a menor contagem de leucócitos totais, de linfócitos e de monócitos no grupo do carbofurano, sugerindo um efeito imunotóxico superior ao do aldicarbe na dose administrada, o que pode ser explicado pelos efeitos tóxicos destas substâncias no baço e na medula óssea (VOS; KRAJNC, 1983; RODGERS, 1995; BANERJEE; KONER; RAY, 1996; VOCCIA et al., 1999; GALLOWAY; HANDY, 2003). Tais efeitos nos parâmetros hematológicos são esperados, haja vista a alta toxicidade destas substâncias (VOS; KRAJNC, 1983; EXON, 1984; RODGERS, 1995; BANERJEE; KONER; RAY, 1996; VOCCIA et al., 1999; MCINTYRE, 2014).

A avaliação da concentração sanguínea dos praguicidas carbamatos é amplamente utilizada em casos de homicídios/suicídios, em casos de mortes de cães (MELITO; FLORIO, 2006), e em estudos experimentais com doses seriadas ou

de cronicidade (GUPTA, 1994; MOSER, 1999; AMENO et al., 2001; PROENÇA et al., 2004; HOFFMANN; HECKER; ABEL, 2008; PELEKIS; EMOND, 2009; SATPAL; JAIN; PUNIA, 2010; BUCARETCHI et al., 2012; SAKUNTHALA TENNAKOON; KARUNARATHNA; UDUGAMPALA, 2013; DIAS et al., 2014; HARABAWY; IBRAHIM, 2014). Entretanto, no presente estudo, com uma única dose letal, de curta duração, já foi possível detectar concentrações distintas de aldicarbe e de carbofurano, denotando e ratificando a rapidez do seu metabolismo, absorção e distribuição (FERGUSON et al., 1984; GUPTA, 1994; YOON et al., 2001; MILATOVIC; GUPTA; ASCHNER, 2006; DIAS et al., 2014; HARABAWY; IBRAHIM, 2014).

3.4 CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo sugerem que, mesmo em casos de intoxicações agudas com altas doses dos praguicidas carbamatos aldicarbe e carbofurano, é possível investigar efeitos imunotóxicos precoces, o que já foi observado em camundongos, bem como lesões teciduais tanto pela bioquímica sérica quanto pela análise histopatológica. Além disso, a mensuração da concentração sanguínea dos carbamatos é um importante parâmetro diagnóstico da intoxicação por praguicidas no *post mortem*.

4. EXUMAÇÃO COMO INSTRUMENTO DE INVESTIGAÇÃO EM CASOS DE INTOXICAÇÃO PELOS CARBAMATOS ALDICARBE E CARBOFURANO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR

4.1 INTRODUÇÃO

A exumação é uma importante ferramenta na investigação de mortes suspeitas, consistindo no desenterramento do cadáver, sua avaliação necroscópica e de todos os vestígios encontrados próximos a ele (SPENNEMANN; FRANKE, 1995; GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; FERLLINI, 2010; FIEDLER et al., 2012; MIRZA et al., 2012). Um dos motivos que leva ao pedido deste exame em humanos é a suspeita de mortes devido a intoxicações por praguicidas, medicamentos e drogas de abuso (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; SPILLER; PFIEFER, 2007; EHRLICH; RIESSELMANN; TSOKOS, 2009; KUMAR et al., 2009; KÄFERSTEIN; STICHT; MADEA, 2013). Com relação aos animais, uma das maiores causas de óbitos suspeitos é a intoxicação exógena intencional por praguicidas, que no Brasil é considerada crime de maus tratos, segundo a Lei Federal 9605/1998. Entretanto, se o animal foi enterrado sem exame necroscópico este crime não é investigado, porque para isso é necessário que seja colhido material para o exame toxicológico, mandatório ao diagnóstico das intoxicações. Com relação aos praguicidas inibidores da enzima acetilcolinesterase, como os carbamatos e os organofosforados, estes também são detectados nas exumações, como em casos de intoxicações em humanos (PROENÇA et al., 2004; KUMAR et al., 2009; ZHOU et al., 2011; SAKUNTHALA TENNAKOON; KARUNARATHNA; UDUGAMPALA, 2013), havendo relato de persistência de organofosforado até 17 anos após o óbito (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997).

Os estudos sobre detecção *post mortem* dos praguicidas carbamatos aldicarbe e carbofurano em intoxicações intencionais em humanos descrevem diversos métodos analíticos e matrizes para o seu diagnóstico, o que não é tão frequente com relação aos animais domésticos e silvestres, (FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; FORRESTER; STANLEY, 2004; WANG et al., 2007; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; GIADINIS et al., 2009; OTIENO et al., 2010;

ANASTASIO; SHARP, 2011; ARNOT et al., 2011; NOVOTNÝ et al., 2011). No Brasil, há casos de intoxicação em cães e gatos por estas substâncias, com análise de casuística de necropsia (XAVIER et al., 2007; MARLET; MAIORKA, 2010; DE SIQUEIRA et al., 2012), nos quais as matrizes de escolha para análise são conteúdo gástrico (XAVIER et al., 2007; BULCÃO et al., 2010; MARLET; MAIORKA, 2010; DE SIQUEIRA et al., 2012), e sangue (MELITO; FLORIO, 2006; BULCÃO et al., 2010). Este cenário é ainda menos frequente com relação à exumação em animais intoxicados por praguicidas, com a existência de somente um estudo experimental com os praguicidas endosulfan e diazinon em coelhos (AKCAN et al., 2009), porém são inexistentes estudos de exumação em casos de suspeitas de intoxicação por praguicidas carbamatos aldicarbe e carbofurano em animais domésticos e silvestres.

Mesmo que nestes casos o cadáver esteja em avançado estado de putrefação, é possível fazer a necropsia e colher material para o exame toxicológico, e matrizes como fígado, humor vítreo, músculo cardíaco e esquelético, sangue e medula óssea podem ser utilizadas, porque as substâncias e/ou seus metabólitos podem permanecer viáveis a este fim (STEVENS, 1984; GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; LECH, 2006; AKCAN et al., 2009; EHRLICH; RIESSELMANN; TSOKOS, 2009; THIEME et al., 2009; CARTISER et al., 2011; GUNASEKERA; COSTAS; BROWN, 2012; KÄFERSTEIN; STICHT; MADEA, 2013).

Pode ocorrer a distribuição *post mortem* das substâncias e de seus metabólitos, que por sua vez é dependente dos fatos ocorridos *ante mortem*, como a toxicocinética, e também das alterações *post mortem*, haja que vista que, dependendo do local da coleta da matriz e de seu estado de conservação, a concentração da substância ou de seus metabólitos pode ser variável, mesmo porque a substância e/ou seu(s) metabólito(s) se difundem do meio mais concentrado ao menos concentrado (POUNDER; JONES, 1990; SPENNEMANN; FRANKE, 1995; GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; PROENÇA et al., 2004; LECH, 2006; EHRLICH; RIESSELMANN; TSOKOS, 2009; THIEME et al., 2009; BUTZBACH, 2010; SKOPP, 2010; OTIENO et al., 2010; GAILLARD et al., 2011; SAAR et al., 2012; HAN et al., 2012; KÄFERSTEIN; STICHT; MADEA, 2013), sendo que o intervalo *post mortem* (IPM) pode alterar a distribuição das substâncias (POUNDER; JONES, 1990; GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; HILBERG et al., 1999; THIEME et al., 2009; GEROSTAMOULOS et al., 2012; SAAR et al., 2012; MCINTYRE, 2014). Os modelos animais para o estudo da distribuição *post mortem*

de drogas e substâncias tóxicas são amplamente utilizados, como ratos e coelhos (HILBERG et al., 1992, 1993; MORIYA; HASHIMOTO, 1999; AKCAN et al., 2009; DESROSIERS et al., 2012).

Além da investigação toxicológica, outras análises podem ser realizadas em cadáveres exumados, como a histopatologia, a qual pode revelar doenças pré-existentes, que podem ou não ter sido diagnosticadas *ante mortem*, modificar diagnósticos *antemortem* ou revelar outras causas de morte, como, por exemplo, traumas ou projeteis balísticos (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; FERLLINI, 2010; FIEDLER et al., 2012; GUNASEKERA; COSTAS; BROWN, 2012; MIRZA et al., 2012; STARKIE; WHITE; THOMPSON, 2013). Há também situações nas quais os tecidos podem ser preservados pelas condições climáticas (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; CARTER; YELLOWLEES; TIBBETT, 2010), ou mesmo pelas próprias substâncias que foram as causadoras da morte (PROENÇA et al., 2004).

Os objetivos deste trabalho são demonstrar as alterações macroscópicas e microscópicas em ratos exumados experimentalmente intoxicados pelos praguicidas carbamatos aldicarbe e carbofurano, bem como a detecção e a concentração destes e de seus metabólitos no *post mortem* imediato no sangue, comparando com os achados e no fígado, músculo esquelético, conteúdo gástrico e humor vítreo nos animais exumados. Além disso, visa-se comparar os possíveis efeitos deletérios ou protetores destas substâncias nos tecidos examinados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, sendo 15 para o experimento com o aldicarbe e 15 para o experimento com o carbofurano, de aproximadamente 250 gramas, com 70 dias, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Foram alocados 5 animais por caixa em ambiente climatizado, à temperatura aproximada entre 24 a 26°C e umidade relativa do ar entre 60 e 70%, com luminosidade artificial, em um ciclo de claro-escuro de 12 horas. O acesso a água e ração é *ad libitum*. Os animais eram ambientados a estas condições cerca de

10 dias antes de sua utilização. Todos os procedimentos experimentais, bem como a condição de acondicionamento dos animais, foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-FMVZ-USP), e recebeu o protocolo de número 2301/2011.

4.2.2 Preparação das soluções de aldicarbe e de carbofurano

Para simular os efeitos da dose letal dos carbamatos aldicarbe e carbofurano geralmente ministrada aos animais intoxicados, cuja dose geralmente é desconhecida, a preparação das soluções aquosas se deu de forma a atingir uma alta dose, já que a DL_{50} do aldicarbe é de 0,5-1,5 mg/kg para os ratos, e a do carbofurano varia de 5-13 mg/kg à mesma espécie. Deste modo, foi preparada uma solução de 50mL com 1 g de grânulos, a partir do grânulo de Temik®, que contém 15% de aldicarbe, de modo a atingir a concentração de 3,0 mg/mL. Foi preparada uma solução de 50mL com 4 g de grânulos de Furadan®, que contém 5% de carbofurano, para atingir a concentração de 4,0 mg/mL.

4.2.3 Protocolo experimental

Foi fornecido 1,5 mL de solução aquosa de aldicarbe por gavagem oral, na concentração de 3,0 mg/mL, por rato ($n = 10$ animais) e 2,0 mL de solução aquosa de carbofurano, na concentração de 4,0 mg/mL, por rato ($n = 10$ animais). Ambas as substâncias foram administradas em dose única. Os animais controles receberam por gavagem 2,0 mL de água ($n = 10$ animais).

4.2.4 Eutanásia, coleta de sangue e formação dos grupos

Após os animais começaram a apresentar os sinais da síndrome colinérgica, tais como aumento da micção, agitação, fasciculações musculares, torpor e coma, foi feita a sedação profunda com uma solução de quetamina (Dopalen 10%, Ceva, 0,3 mL/animal) e xilazina (Anasedan 2%, Vetbrands, 0,2 mL/animal). Após o avaliar

a sensibilidade a dor, quando não houve nenhuma reação aos testes de sensibilidade, foi feita a colheita do sangue por punção cardíaca, cujo volume médio colhido foi de 8 mL para a realização do exame. Os animais vinham a óbito logo após a colheita do sangue. Ao final, todos os animais foram pesados e identificados.

4.2.5 Procedimentos para exumação

Para o procedimento de exumação, foram preparadas 5 caixas plásticas com dimensões de 47 cm x 31 cm x 29 cm, lacradas, e de suas tampas foi retirada uma janela de 20 cm x 9 cm e colada uma tela para que houvesse uma via de ventilação. Com este procedimento procurou-se evitar o acesso de insetos. O local onde foram colocadas as caixas era fechado, com uma porta de metal com entrada de ar, na qual também foi colocada tela. Foram utilizados 3 animais por dia de exumação, sendo dois experimentais e um controle; as caixas foram identificadas com fitas coloridas, conforme segue: vermelha: 1 dia *post mortem* - animais 1, 2 e controle 1; verde: 3 dias *post mortem* - animais 3, 4 e controle 2; amarela: 5 dias *post mortem* - animais 5, 6 e controle 3; rosa: 7 dias *post mortem* - animais 7, 8 e controle 4; azul: 10 dias *post mortem* - animais 9 e 10 e controle 5. Além disso, no lado de fora da caixa foi colocada esta numeração para identificar os animais. Este procedimento foi realizado para os animais experimentalmente intoxicados por aldicarbe e para os intoxicados por carbofurano - os experimentos foram realizados separadamente.

A caixa foi preenchida com terra de jardim, sendo que foi colocada até atingir 12,0 cm de altura. Os ratos foram dispostos em decúbito dorsal, distantes 10,0 cm um do outro, com o animal controle no meio. Os cadáveres foram completamente recobertos por mais 30 cm de terra. As cinco caixas foram colocadas uma ao lado da outra. Para a mensuração da temperatura e da umidade, foi instalado um termo-higrômetro dentro do local no qual foram dispostas as caixas. Foi medida a temperatura ambiente (T_{ambiente}) e a da terra das caixas (T_{interna}).

4.2.6 Necropsia e colheita de material biológico

A necropsia foi realizada sempre no mesmo horário. Foi feito o registro fotográfico de todo o procedimento, antes e após a abertura das cavidades. Foram colhidos fragmentos do cérebro, pulmão, coração, fígado, pâncreas, rim e adrenal para o exame histopatológico, sempre que possível, pois, dependendo do intervalo *post mortem* (IPM), já não era imediata a identificação das vísceras. Os fragmentos foram colocados em solução de formol a 10%, e processados após 72 horas, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 5µm foram corados pela hematoxilina e eosina. As lâminas foram revisadas pelos autores. Para o exame toxicológico foram colhidos aproximadamente 2 g de fígado, 2 g de músculo esquelético, todo o conteúdo gástrico e o humor vítreos dos dois olhos, colocados em embalagem plástica individual fechada e conservados a -80° C até seu processamento.

4.2.7 Exame toxicológico

4.2.7.1 Extração líquido-líquido

Os melhores índices de recuperação dos carbamatos e metabólitos em matrizes biológicas foram obtidos conforme os seguintes procedimentos: 1) foram utilizados 4 mL de sangue, ao qual foi adicionado o padrão interno; 2) foi adicionado na proporção de 1:1 uma mistura de éter:clorofórmio; 3) Foi realizada a agitação por 60 minutos em agitador tipo vortex automático; 4) após a agitação foi realizada uma centrifugação a 4000 rpm sobre uma temperatura de 4°C por 3 minutos; 5) a porção etérea foi separada e filtrada através de sulfato de sódio anidro; 6) o resíduo da filtração foi evaporado em capela a temperatura ambiente e o mesmo foi reconstituído com acetonitrila a qual foi filtrada em filtros de poros de 0,22 µm, e esse extrato foi injetado no cromatógrafo e analisado pela cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD - Agilent 1100, Agilent Technologies).

4.2.7.2 Método de análise por CLAE-DAD

As condições ótimas de separação e análise dos carbamatos e metabólitos foram obtidas utilizando-se fluxo de 1,0 mL/min no modo de eluição gradiente com programação linear, iniciando com 100% de água e 0% de acetonitrila (ACN) até 80% de ACN/H₂O em 30 min; temperatura da coluna selecionada em 30 °C; volume de injeção 20 µL e detector de arranjo de diodos, selecionado para detecção simultânea nos seguintes comprimentos de onda: 203 e 246. O comprimento de onda de absorção para aldicarbe foi 246 nm; para 3-hidroxicarbofurano, aldicarbe sulfóxido, aldicarbe sulfona, carbofurano e metiocarbe em 203 nm. Nestas condições, os carbamatos e seus metabólitos foram analisados em uma corrida cromatográfica de 60 minutos. Após cada análise a coluna foi limpa com 50% de ACN/H₂O até 100% de ACN em 5 minutos. O retorno às condições iniciais para nova análise foi de 100% de ACN até 100% de água. A coluna foi mantida nas condições iniciais de análise por 10 minutos antes de nova injeção para estabilização. Os padrões analíticos utilizados foram aldicarb Pestanal (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), aldicarb sulfona Pestanal (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), aldicarb sulfóxido Pestanal (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), carbofurano (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e carbofurano-3-hidroxi Pestanal (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análise de temperatura e umidade

Na figura 16, os gráficos representam a variação de temperatura (esquerda) e de umidade (direita).

Figura 16 - Variação de temperatura ambiente (T_{ambiente}), da temperatura da terra (T_{interna}) entre os 10 dias de experimentos com os animais intoxicados por aldicarbe e por carbofurano (esquerda). Variação da umidade entre os 10 dias de experimento (direita)

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

A Figura 17 representa a variação de peso corporal entre o dia 0 e o dia correspondente da exumação.

Figura 17 – Variação de peso corporal entre o dia 0 (intoxicação) e o dia da exumação nos 10 dias de experimentos com os animais intoxicados por aldicarbe e por carbofurano

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

4.3.2 Análise macroscópica

Nas figuras 18 e 19 é possível verificar as alterações *post mortem* nos animais exumados intoxicados por aldicarbe e por carbofurano.

Figura 18 – Exumação: Ratos Wistar intoxicados experimentalmente com aldicarbe (3,0 mg/mL)

Legenda: A-24 horas *post mortem*; B-10 dias *post mortem*. Em A nota-se que as vísceras estão bem definidas, e com a coloração próxima ao esperado no *post mortem* imediato. Já em B, nota-se que a coloração está modificada, com as vísceras mais escuras e há distensão gasosa. Alguns órgãos, como o pâncreas, os rins e as glândulas adrenais estavam irreconhecíveis ou totalmente putrefatos.

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 19 – Exumação: Ratos Wistar intoxicados experimentalmente com carbofurano (4,0 mg/mL)

Legenda: A-24 horas *post mortem*; B-10 dias *post mortem*. Em relação à figura 2, observou-se que as vísceras estavam melhor conservadas, embora também houvessem transcorrido as alterações *post mortem*.

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

4.3.3 Análise microscópica

Nas figuras 20 a 23 é possível verificar as alterações histológicas *post mortem* nos animais intoxicados por aldicarbe e por carbofurano. Os órgãos avaliados foram o cérebro (Figura 20), fígado (Figura 21), pulmão (Figura 22) e rim (Figura 23).

Figura 20 – Comparação entre as fotomicrografias do cérebro dos ratos Wistar intoxicados experimentalmente com aldicarbe (imagens à esquerda) (3,0 mg/mL) e carbofurano (imagens à direita) exumados 24 horas, 3 dias, 5 dias, 7 dias e 10 dias *post mortem* (n=2 animais/grupo)

Legenda: Fotomicrografias do cérebro dos ratos Wistar exumados - aldicarbe; **A**: mostra o cérebro com 24 horas *post mortem*, com congestão e hemorragia em meninge e em encéfalo, com integridade das hemácias e início de autólise tecidual, aumento de 200x; **C**: 3 dias *post mortem*, nota-se a autólise, com degeneração neuronal, aumento de 400x; **E**: 5 dias *post mortem*, com acentuação da autólise e início do surgimento de bactérias (setas), 400x; **G**:

7 dias *post mortem*, há maior proliferação de colônias bacterianas (setas), aumento de 400x; **I**: 10 dias *post mortem* nota-se resquícios de neurônios e destruição tecidual acentuada, aumento de 200x. Barra = 50 μ m; Fotomicrografias do cérebro dos ratos Wistar exumados - carbofurano; **B**: mostra o cérebro com 24 horas *post mortem*, com início de autólise e evidência de hemorragia, aumento de 200x; **D**: 3 dias *post mortem*, com evidência de congestão e início de degradação de hemácias, aumento de 400x; **F**: 5 dias *post mortem*, ao centro do campo nota-se degradação de vaso sanguíneo e autólise, aumento de 200x; **H**: 7 dias *post mortem*, há destruição tecidual e resquícios de neurônios (setas), aumento de 400x; **j**: 10 dias *post mortem*, há acentuação do processo visto em **D**, com resquícios de neurônios (seta) e colônia de bactérias (estrela), aumento de 400x. Barra = 50 μ m.

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 21 –Comparação entre as fotomicrografias do fígado dos ratos Wistar intoxicados experimentalmente com aldicarbe (imagens à esquerda) (3,0 mg/mL) e carbofurano (imagens à direita) exumados 24 horas, 3 dias, 5 dias, 7 dias e 10 dias post mortem (n=2 animais/grupo)

Legenda: Fotomicrografias do fígado dos ratos Wistar exumados - aldicarbe; **A**: mostra o fígado com 24 horas *post mortem*, com a preservação da arquitetura tecidual, e congestão, com integridade de hemácias, aumento de 100x; **C**: 3 dias *post mortem*, com perda da arquitetura tecidual, ausência de núcleo, colônia de bactérias (seta) e pigmentos (estrela),

aumento de 400x; **E**: 5 dias *post mortem*, com acentuação de processo visto em **C**, com colônias de bactérias (seta), aumento de 200x ; **G**: 7 dias *post mortem*, com colônia de bactérias (seta), aumento de 400x ; **I**: 10 dias *post mortem*, com presença de pigmentos acastanhados (seta), aumento de 400x. Fotomicrografias do fígado dos ratos Wistar exumados - carbofurano; **B**: mostra o fígado com 24 horas *post mortem*, com congestão, preservação das hemácias e da arquitetura tecidual, aumento de 400x; **D**: 3 dias *post mortem*, início da autólise, com degeneração de vaso sanguíneo, aumento de 400x; **F**: 5 dias *post mortem*, autólise avançada, com perda de arquitetura tecidual, aumento de 100x; **H**: 7 dias *post mortem*, com presença de pigmentos (seta) e colônia de bactérias (estrela), aumento de 400x; **J**: 10 dias *post mortem*, com avanço do processo visto em **D**, aumento de 100x. Barra = 50µm.

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 22 – Comparação entre as fotomicrografias do pulmão dos ratos Wistar intoxicados experimentalmente com Aldicarbe (imagens à esquerda) (3,0 mg/mL) e carbofurano (imagens à direita) exumados 24 horas, 3 dias, 5 dias, 7 dias e 10 dias *post mortem* (n=2 animais/grupo)

Legenda: Fotomicrografias do pulmão dos ratos Wistar exumados - Aldicarbe; **A**: mostra o pulmão com 24 horas *post mortem*, com preservação da arquitetura tecidual, congestão, hemorragia e preservação das hemácias, aumento de 100x; **C**: 3 dias *post mortem*, com degeneração de hemácias e início de autólise, aumento de 100x; **E**: 5 dias *post mortem*,

com acentuação da autólise, aumento de 100x; **G**: 7 dias *post mortem*, perda da arquitetura tecidual, presença de pigmentos (seta), aumento de 200x; **I**: 10 dias *post mortem*, nota-se só o enfisema e pigmentos (seta), aumento de 200x; Fotomicrografias do pulmão dos ratos Wistar exumados - carbofurano; **B**: mostra o pulmão com 24 horas *post mortem*, com congestão e hemorragia evidente, aumento de 40x; **D**: 3 dias *post mortem*, com presença de pigmentos (seta) e colônia de bactérias (estrelas), aumento de 400x; **F**: 5 dias *post mortem*, presença de colônia de bactérias (estrela), e pigmentos (seta), em menor proporção do que em **C**, aumento de 400x; **H**: 7 dias *post mortem*, nota-se o enfisema e pigmentos (seta), aumento de 100x; **J**: 10 dias *post mortem*, presença de pigmentos (setas), aumento de 100x. Barra = 50 μ m.
Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Figura 23 – Comparação entre as fotomicrografias do rim dos ratos Wistar intoxicados experimentalmente com Aldicarbe (imagens à esquerda) (3,0 mg/mL) e carbofurano (imagens à direita) exumados 24 horas, 3 dias, 5 dias, 7 dias e 10 dias *post mortem* (n=2 animais/grupo)

Legenda: Fotomicrografias do rim dos ratos Wistar exumados - Aldicarbe; **A**: mostra o rim com 24 horas *post mortem*, no qual há hemorragia e congestão, com início de autólise, aumento de 100x; **C**: 3 dias *post mortem*, acentuação do processo visto em **A**, aumento de 200x; **E**: 5 dias *post mortem*, autólise acentuada, aumento de 200x; **G**: 7 dias *post mortem*, destruição

tecidual, aumento de 400x; **I**: 10 dias *post mortem*, destruição tecidual, aumento de 200x; Fotomicrografias do rim dos ratos Wistar exumados - carbofurano; **B**: mostra o rim com 24 horas *post mortem*, com início de autólise, aumento de 200x; **D**: 3 dias *post mortem*, há acentuação do processo visto em **B**, aumento de 400x; **F**: 5 dias *post mortem*, nota-se os túbulos em alto grau de autólise, aumento de 200x; **H**: 7 dias *post mortem*, tecido em putrefação com colônia de bactérias (seta), aumento de 200x; **J**: 10 dias *post mortem*, com total destruição tecidual e colônias de bactérias (seta), aumento de 400x. Barra = 50µm. Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

4.3.4 Concentrações de aldicarbe e de carbofurano

Nas tabelas 8 e 9 estão descritas as concentrações do aldicarbe e de seus metabólitos aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, e do carbofurano e seu metabólito 3-hidroxicarbofurano. No dia zero, em que foi feita a intoxicação, foi medida a concentração sanguínea, e nos dias das exumações, a concentração das substâncias no fígado, humor vítreo, musculo esquelético e conteúdo gástrico.

Tabela 8 – Concentração no sangue cardíaco (µg/mL) dos carbamatos aldicarbe e carbofurano no *post mortem* imediato

Animal	Carbofurano* (µg/mL sangue)	Aldicarbe* (µg/mL sangue)
1	7,87	8,52
2	8,09	1,58
3	2,15	1,72
4	4,78	3,91
5	0,95	5,54
6	1,62	2,83
7	2,89	4,11
8	2,74	5,90
9	2,31	2,08
10	1,51	8,17

*não foram detectados os metabólitos

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

Tabela 9 – Concentração dos carbamatos aldicarbe e carbofurano nos ratos exumados entre os dia 1 e 10 de exumação no fígado, conteúdo gástrico, músculo esquelético e humor vítreo

Matriz	Animal	Dias após a intoxicação	Carbofurano (µg/g)	3-OH Carbofurano (µg/g)	Aldicarbe (µg/g)	Aldicarbe sulfona (µg/g)	Aldicarbe sulfóxido (µg/g)
Fígado	1	1	0,04	0	0,12	0	0
	2		0,041	0,011	0,13	0,94	0,029
	3	3	0,78	0,015	0,38	1,05	0,094
	4		0,83	0,033	0,42	0	0
	5	5	1,11	0,37	0,64	0	0
	6		1,33	0,44	0,74	0	0
	7	7	2,64	0,51	0,94	0	0
	8		2,72	0,75	0,95	0	0
	9	10	7,57	2,21	1,55	0	0
	10		7,68	2,45	1,7	0	0
Conteúdo gástrico	1	1	1959,36	0	831,8	3,12	46,08
	2		1516,25	0	213,02	0	176,03
	3	3	798,06	3,53	308,84	38,27	222,43
	4		141,59	0	78,54	84,54	22,44
	5	5	361,16	0	0	87,25	73,46
	6		72,12	0	na	na	na
	7	7	1996,94	1588,56	1437,81	0	371,67
	8		425,98	0	4768,08	0	0
	9	10	na	na	na	na	na
	10		na	na	na	na	na
Músculo esquelético	1	1	26,51	0	13,83	25,68	0
	2		34,56	0	14,27	0	0
	3	3	31,93	0	0	0	0
	4		67,01	0	0	21,97	0
	5	5	57,64	0	23,56	25,81	0
	6		152,22	0	27,75	0	13,29
	7	7	416,66	0	155,09	74,36	11,83
	8		127,17	313,57	5,56	57,93	6,37
	9	10	273,14	0	42,6	68,1	86,33
	10		1445,76	328,78	na	na	na
Humor vítreo	1	1	81,13	0	0	0	0
	2		121,48	0	0	0	0
	3	3	180,01	0	0	1,91	0
	4		109,17	0	0	0	0
	5	5	249,29	0	42,62	2,33	27,49
	6		119,76	18,64	0	0	15,68
	7	7	31,57	0	33,73	1,48	99,35
	8		68,15	0	3,76	0	3,05
	9	10	na	na	na	na	na
	10		na	na	na	na	na

*na: matriz não disponível

Fonte: (SIQUEIRA, 2014)

4.4 DISCUSSÃO

As intoxicações por praguicidas são uma realidade em todo o mundo (GRENDON; FROST; BAUM, 1994; COVACI et al., 1999; NELSON et al., 2001; SINGH et al., 2007; GIADINIS et al., 2009; KUMAR et al., 2009; CAMPELO; CALDAS, 2010), o que também inclui os animais (GRENDON; FROST; BAUM, 1994; FRAZIER et al., 1999; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; GIADINIS et al., 2009; DE SIQUEIRA et al., 2012; MAHDI; VAN DER MERWE, 2013). Os praguicidas carbamatos aldicarbe e carbofurano, que são potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase e altamente tóxicos (BARON; MERRIAM, 1988; BARON, 1994; GUPTA, 1994; PROENÇA et al., 2004; MILATOVIC; GUPTA; ASCHNER, 2006), são comumente utilizados para intoxicar intencionalmente pessoas (NISSE et al., 2002; PROENÇA et al., 2004; REBELO et al., 2011; ZHOU et al., 2011; SAKUNTHALA TENNAKOON; KARUNARATHNA; UDUGAMPALA, 2013) e animais (FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; OTIENO et al., 2010; ANASTASIO; SHARP, 2011; ARNOT et al., 2011; NOVOTNÝ et al., 2011; DE SIQUEIRA et al., 2012). Entretanto, não há relatos sobre exumações de cadáveres destes animais para o diagnóstico de intoxicação por praguicidas, o que já é feito em humanos (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; KUMAR et al., 2009) e experimentalmente em coelhos (AKCAN et al., 2009).

A análise toxicológica do conteúdo gástrico determina se ocorreu ingestão recente de uma substância, a do fígado e do humor vítreo se houve alterações significativas das concentrações das substâncias com relação à concentração no sangue periférico no *post mortem* (DRUMMER et al., 2013). O fígado e o conteúdo gástrico são as matrizes mais utilizadas para o diagnóstico toxicológico *post mortem* das intoxicações pelos carbamatos aldicarbe e carbofurano em cães e gatos (FRAZIER et al., 1999; MOTAS-GUZMÁN et al., 2003; XAVIER et al., 2007; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007c; ARNOT et al., 2011), embora seja possível também utilizar o sangue nestes casos (AMENO et al., 2001; MELITO; FLORIO, 2006; BULCÃO et al., 2010; SAKUNTHALA TENNAKOON; KARUNARATHNA; UDUGAMPALA, 2013). As matrizes selecionadas ao exame toxicológico, como o sangue colhido *antemortem*, e as provenientes dos animais exumados, como o fígado, o conteúdo

gástrico, o músculo esquelético e o humor vítreo apresentaram altas concentrações dos carbamatos aldicarbe, carbofurano, e de seus metabólitos, apesar de a intoxicação experimental ter sido aguda e fatal, nas quais os animais morreram em menos de 10 minutos. Conforme estudos com drogas de abuso (POUNDER; JONES, 1990; HILBERG et al., 1993; SKOPP, 2010; DESROSIERS et al., 2012; HAN et al., 2012; SAAR et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; KÄFERSTEIN; STICHT; MADEA, 2013), tal achado se refere à distribuição *post mortem* das substâncias, que varia com o local de coleta e do intervalo *post mortem* (POUNDER; JONES, 1990; SKOPP, 2010; GEROSTAMOULOS et al., 2012; DRUMMER et al., 2013), que também pode sofrer interferência de metabolismo bacteriano (ELLIOTT; LOWE; SYMONDS, 2004; SKOPP, 2010; DRUMMER et al., 2013). As concentrações das substâncias podem aumentar drasticamente nas vísceras devido à desidratação e ao posicionamento do cadáver, pois depende do órgão ou local de onde se coleta a matriz (FLANAGAN; CONNALLY; EVANS, 2005; BUTZBACH, 2010; SKOPP, 2010; WYMAN, 2012; CARVALHO et al., 2013). Além disso, outros fatores como a distribuição incompleta das substâncias no momento do óbito e a sua difusão passiva dos vasos sanguíneos ou de cavidades aos órgãos próximos também influem na sua concentração *post mortem* (SKOPP, 2010; GEROSTAMOULOS et al., 2012; SAAR et al., 2012; DRUMMER et al., 2013). O estômago, fígado, pulmões e miocárdio são as principais fontes da distribuição *post mortem* de substâncias (SKOPP, 2010). Nossos achados corroboram com este fato, já que foram encontradas concentrações com alta variabilidade entre as matrizes.

Outros aspecto a ser analisado no caso das exumações motivadas por suspeitas de intoxicações por substâncias tóxicas é a conservação de um cadáver, que depende das condições de sepultamento, temperatura, umidade, bem como de substâncias que podem estar em seus tecidos, como drogas e substâncias tóxicas, como os praguicidas (HILBERG et al., 1993; GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; TURNER; WILTSHIRE, 1999; BREITMEIER et al., 2005; LECH, 2006; WILSON et al., 2007; ERLANDSSON; MUNRO, 2007; PRANGNELL; MCGOWAN, 2009; CARTER; YELLOWLEES; TIBBETT, 2010; FERLLINI, 2010; KÄFERSTEIN; STICHT; MADEA, 2013; STARKIE; WHITE; THOMPSON, 2013). Isto influencia na proliferação bacteriana, que acelera a decomposição (TURNER; WILTSHIRE, 1999; WILSON et al., 2007; PRANGNELL; MCGOWAN, 2009), o que também depende do metabolismo tecidual (CONWAY; GEOGHEGAN; MCCORMACK, 1955; MADEA,

2005; ERLANDSSON; MUNRO, 2007; HENSSGE; MADEA, 2007) e das condições do corpo no período *antemortem* (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; BREITMEIER et al., 2005). No presente estudo, observou-se colônias bacterianas no cérebro, fígado, pulmão e rim dos animais intoxicados pelo carbofurano, e nos intoxicados pelo aldicarbe no cérebro e no fígado, o que certamente influenciou a autólise e posterior putrefação tecidual, embora o cérebro tenha sido o órgão que mais manteve a arquitetura tecidual. Isso vai de encontro com estudos que relatam ser possível fazer diagnósticos de doenças no sistema nervoso central mesmo após muitos anos de óbito (GRELLNER; GLENEWINKEL, 1997; OMALU et al., 2005). A proliferação bacteriana, por sua vez, pode ter sido acelerada pelas condições de umidade, temperatura da terra e temperatura ambiente (TURNER; WILTSHIRE, 1999; PRANGNELL; MCGOWAN, 2009; CARTER; YELLOWLEES; TIBBETT, 2010), que apresentaram maiores altas nos dias das exumações dos animais intoxicados pelo carbofurano. Além disso, ao avaliar a perda de peso relativa entre o dia do óbito e o dia da exumação, verificou-se que os animais do grupo do carbofurano apresentaram maior taxa de variação de perda de peso, que se acentuou no grupo aldicarbe a partir do 7º dia *post mortem*. Isso também foi confirmado na necropsia, porque os animais intoxicados pelo carbofurano apresentaram putrefação mais acelerada, geralmente a partir do terceiro dia, com distensão gasosas das alças mais acentuada. Relatos apontam achados semelhantes, já que possivelmente o aldicarbe tivesse uma propriedade característica de retardar a putrefação de um cadáver, que apresentou boas condições de conservação após 8 dias de óbito exposto ao ambiente (PROENÇA et al., 2004), o que também acontece com organofosforados em casos de exumação (KUMAR et al., 2009).

4.5 CONCLUSÃO

O presente modelo experimental mostrou ser possível detectar os praguicidas carbamatos aldicarbe e carbofurano em matrizes de ratos exumados em diferentes intervalos *post mortem*, além de demonstrar que os carbamatos aldicarbe e carbofurano podem apresentar algum efeito de retardo da putrefação. Deste modo, preconiza-se que, nos casos de suspeita de intoxicação intencional em animais domésticos e silvestres que tenham sido enterrados, ou com intervalo *post mortem* desconhecido, seja feita a necropsia e a coleta de material para a análise histopatológica e toxicológica, pois este último é mandatório para comprovar a intoxicação e, portanto, crucial para a investigação criminal.

5 CONCLUSÃO GERAL

A intoxicação exógena intencional fatal de animais domésticos e silvestres ainda é uma realidade nacional e mundial, que precisa ser analisada quanto aos aspectos patológicos, toxicológicos e jurídicos, já que os indivíduos que adquirem as substâncias para este fim o fazem de forma ilícita, e a fiscalização da venda e comércio destas substâncias precisa ser intensificada. Além disso, o intercâmbio de informações entre o patologista veterinário e o toxicologista deve ser realizado, para que a coleta correta de matriz biológica seja feita de forma correta, de acordo com o método analítico apropriado, de acordo com as características moleculares de cada analito. A análise da casuística de cães e gatos, bem como os estudos experimentais em ratos Wistar, revelaram lesões microscópicas semelhantes, de caráter congestivo e hemorrágico sistêmico. Tais achados advêm de uma interação complexa entre os efeitos tóxicos da exposição aguda aos carbamatos aldicarbe e carbofurano, que, embora sejam da mesma classe de pesticidas, apresentam lesões com características diferentes, como o caráter de sua distribuição.

Os estudos experimentais se fazem necessários para a compreensão dos efeitos tóxicos das substâncias nos tecidos, nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, indicando que, mesmo em casos de intoxicação aguda, podem surgir parâmetros indicativos de lesões de caráter mais crônico, como a imunotoxicidade, que pode ser explicada pela alta dose ingerida e absorvida das substâncias. O presente estudo mostrou ser possível detectar e quantificar os praguicidas carbamatos aldicarbe e carbofurano em matrizes de ratos exumados em diferentes intervalos *post mortem*. É recomendável que, nos casos de suspeita de intoxicação intencional em animais domésticos e silvestres que tenham sido enterrados, ou com intervalo *post mortem* desconhecido seja feita a necropsia e a coleta de material para a análise toxicológica, pois este é o único modo de comprovar a intoxicação e, portanto, crucial para a investigação criminal.

REFERÊNCIAS

- AKCAN, R.; HILAL, A.; DAGLIOGLU, N.; CEKIN, N.; GULMEN, M. K. Determination of pesticides in postmortem blood and bone marrow of pesticide treated rabbits. **Forensic Science International**, v. 189, n. 1-3, p. 82–7, 10 ago. 2009.
- AMENO, K.; LEE, S. K.; IN, S. W.; YANG, J. Y.; YOO, Y. C.; AMENO, S.; KUBOTA, T.; KINOSHITA, H.; IJIRI, I. Blood carbofuran concentrations in suicidal ingestion cases. **Forensic Science International**, v. 116, n. 1, p. 59–61, 2001.
- ANASTASIO, J. D.; SHARP, C. R. Acute aldicarb toxicity in dogs: 15 cases (2001-2009). **Journal Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 21, n. 3, p. 253–260, 2011.
- ARKOW, P. Child abuse, animal abuse, and the veterinarian. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 7, p. 1004–1007, 1994.
- ARNOT, L. F.; VEALE, D. J.; STEYL, J. C.; MYBURGH, J. G. Treatment rationale for dogs poisoned with aldicarb (carbamate pesticide). **Journal of South African Veterinary Association**, v. 82, n. 4, p. 232–238, 2011.
- ASCIONE, F. R.; SHAPIRO, K. People and animals, kindness and cruelty: research directions and policy implications. **Journal of Social Issues**, v. 65, p. 569–587, 2009.
- BANERJEE, B. D.; KONER, B. C.; RAY, A. Immunotoxicity of pesticides: perspectives and trends. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 34, n. 8, p. 723–733, 1996.
- BARON, R. L. A carbamate insecticide: a case study of aldicarb. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 23–27, 1994. Suppl.
- BARON, R. L.; MERRIAM, T. L. Toxicology of aldicarb. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 105, p. 1–70, jan. 1988.
- BONHAM, A. C. Neurotransmitters in the CNS control of breathing. **Respiratory Physiology**, v. 101, n. 3, p. 219–230, 1995.
- BREITMEIER, D.; GRAEFE-KIRCI, U.; ALBRECHT, K.; WEBER, M.; TROGER, H. D.; KLEEMANN, W. J. Evaluation of the correlation between time corpses spent in in-ground graves and findings at exhumation. **Forensic Science International**, v. 154, n. 2-3, p. 218–223, 2005.
- BRKIC, D. V.; VITOROVIC, S. L.; GASIC, S. M.; NESKOVIC, N. K. Carbofuran in water: Subchronic toxicity to rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 334–341, 2008.

BUCARETCHI, F.; PRADO, C. C.; BRANCO, M. M.; SOUBHIA, P.; METTA, G. M.; MELLO, S. M.; DE CAPITANI, E. M.; LANARO, R.; HYSLOP, S.; COSTA, J. L.; FERNANDES, L. C.; VIEIRA, R. J. Poisoning by illegal rodenticides containing acetylcholinesterase inhibitors (chumbinho): a prospective case series. **Clinical Toxicology**, v. 50, n. 1, p. 44–51, 2012.

BULCÃO, R. P.; TONELLO, R.; PIVA, S. J.; SCHMITT, G. C.; EMANUELLI, T.; E., D.; GARCIA, S. C. Intoxication in dogs and cats: toxicological diagnosis using thin layer chromatography and high pressure liquid chromatography with ultraviolet detection in stomach samples. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1109–1113, 2010.

BURTON, M. D.; KAZEMI, H. Neurotransmitters in central respiratory control. **Respiratory Physiology**, v. 122, n. 2-3, p. 111–121, 2000.

BUTZBACH, D. M. The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results. **Forensic Science, Medicine, And Pathology**, v. 6, n. 1, p. 35–45, mar. 2010.

BYARD, R. W.; BOARDMAN, W. The potential role of forensic pathologists in veterinary forensic medicine. **Forensic Science, Medicine, And Pathology**, v. 7, n. 3, p. 231–232, set. 2011.

CAMPELO, E. L. C.; CALDAS, E. D. Postmortem data related to drug and toxic substance use in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008. **Forensic Science International**, v. 200, n. 1-3, p. 136–140, 2010.

CARTER, D. O.; YELLOWLEES, D.; TIBBETT, M. Moisture can be the dominant environmental parameter governing cadaver decomposition in soil. **Forensic Science International**, v. 200, n. 1-3, p. 60–66, 2010.

CARTISER, N.; BÉVALOT, F.; FANTON, L.; GAILLARD, Y.; GUITTON, J. State-of-the-art of bone marrow analysis in forensic toxicology: a review. **International Journal Of Legal Medicine**, v. 125, n. 2, p. 181–198, mar. 2011.

CARVALHO, V. M.; FUKUSHIMA, A. R.; FONTES, L. R.; FUZINATO, D. V.; FLORIO, J. C.; CHASIN, A. A. Cocaine postmortem distribution in three brain structures: a comparison with whole blood and vitreous humour. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 143–145, 2013.

CHATELAIN, D.; HEBERT, A.; TROUILLET, N.; CHARFI, S.; STEPHENS, P.; MANAOUIL, C.; DEFOUILLOY, C.; BRACONNIER, L.; JARDE, O.; SEVESTRE, H. Effectiveness of histopathologic examination in a series of 400 forensic autopsies. **Annales de Pathologie**, v. 32, p. 4–13, 2012.

CONWAY, E. J.; GEOGHEGAN, H.; MCCORMACK, J. I. Autolytic changes at zero centigrade in ground mammalian tissues. **Journal of Physiology**, v. 130, p. 427–437, 1955.

COOPER, J. E.; COOPER, M. E. Forensic veterinary medicine: a rapidly evolving discipline. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 4, n. 2, p. 75–82, jan. 2008.

COUPLAND, R. E.; PARKER, T. L.; KESSE, W. K.; MOHAMED, A. A. The innervation of the adrenal gland. III. Vagal innervation. **Journal of Anatomy**, v. 163, p. 173–181, 1989.

COVACI, A.; MANIRAKIZA, P.; COUCKE, V.; BECKERS, R.; JORENS, P. G.; SCHEPENS, P. A case of aldicarb poisoning: a possible murder attempt. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 23, n. 4, p. 290–293, 1999.

DE SIQUEIRA, A.; CASSIANO, F. C.; MARLET, E. F.; LANDI, M. F. D. A.; MAIORKA, P. C. Non-accidental injuries found in necropsies of domestic cats: a review of 191 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 10, p. 723–728, 2012.

DE ZEEUW, R. A. Substance identification: the weak link in analytical toxicology. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences**, v. 811, n. 1, p. 3–12, 5 nov. 2004.

DEARMOND, P. D.; BRITTAIN, M. K.; PLATOFF JR., G. E.; YEUNG, D. T. QuEChERS-based approach toward the analysis of two insecticides, methomyl and aldicarb, in blood and brain tissue. **Analytical Methods**, v. 7, n. 1, p. 321–328, 2015.

DEGUE, S.; DILILLO, D. Is animal cruelty a “red flag” for family violence? Investigating co-occurring violence toward children, partners, and pets. **Journal of Interpersonal Violence**, v. 24, n. 6, p. 1036–1056, jun. 2009.

DESROSIERS, N. A.; WATTERSON, J. H.; DEAN, D.; WYMAN, J. F. Detection of amitriptyline, citalopram, and metabolites in porcine bones following extended outdoor decomposition. **Journal of Forensic Sciences**, v. 57, n. 2, p. 544–549, 2012.

DIAS, E.; MORAIS, S.; RAMALHEIRA, E.; PEREIRA, M. L. Characterization of the toxicological effects of aminocarb on rats: hematological, biochemical, and histological analyses. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 77, n. 14-16, p. 849–855, 2014.

DRUMMER, O. H.; KENNEDY, B.; BUGEJA, L.; IBRAHIM, J. E.; OZANNE-SMITH, J. Interpretation of postmortem forensic toxicology results for injury prevention research. **Injury Prevention : Journal of the International Society for Child and Adolescent Injury Prevention**, v. 19, n. 4, p. 284–289, ago. 2013b.

EDVINSSON, L.; FALCK, B.; OWMAN, C. Possibilities for a cholinergic action on smooth musculature and on sympathetic axons in brain vessels mediated by muscarinic and nicotinic receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 200, n. 1, p. 117–126, 1977.

EHRlich, E.; RIESSELMANN, B.; TSOKOS, M. A series of hospital homicides. **Legal Medicine (Tokyo)**, v. 11, p. S100–102, 2009. Suppl 1.

ELHUSSEINY, A.; COHEN, Z.; OLIVIER, A.; STANIMIROVIC, D. B.; HAMEL, E. Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 19, n. 7, p. 794–802, 1999.

ELLIOTT, S.; LOWE, P.; SYMONDS, A. The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. **Forensic Science International**, v. 139, n. 2-3, p. 183–190, 2004.

ERLANDSSON, M.; MUNRO, R. Estimation of the post-mortem interval in beagle dogs. **Science & Forensic Science Society**, v. 47, n. 4, p. 150–154, dez. 2007.

ESTRADA, C.; KRAUSE, D. N. Muscarinic cholinergic receptor sites in cerebral blood vessels. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 221, n. 1, p. 85–90, 1982.

EXON, J. H. The immunotoxicity of selected environmental chemicals, pesticides and heavy metals. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 161, p. 355–368, 1984.

FELTHOUS, A R. Childhood cruelty to cats, dogs and other animals. **The Bulletin of the American Academy of Psychiatry and the Law**, v. 9, n. 1, p. 48–53, jan. 1981.

FERGUSON, P. W.; DEY, M. S.; JEWELL, S. A.; KRIEGER, R. I. Carbofuran metabolism and toxicity in the rat. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 4, n. 1, p. 14–21, 1984.

FERLLINI, R. Tissue preservation and projectile context in a Spanish Civil War victim. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 17, n. 5, p. 285–288, 2010.

FERSLEW, K. E.; HAGARDORN, A. N.; MCCORMICK, W. F. Poisoning from oral ingestion of carbofuran (Furadan 4F), a cholinesterase-inhibiting carbamate insecticide, and its effects on cholinesterase activity in various biological fluids. **Journal of Forensic Sciences**, v. 37, n. 1, p. 337–344, 1992.

FIEDLER, S.; BREUER, J.; PUSCH, C. M.; HOLLEY, S.; WAHL, J.; INGWERSEN, J.; GRAW, M. Graveyards - special landfills. **Science of Total Environment**, v. 419, p. 90–97, 2012.

FIERRO, M. F. Identification of human remains. In: SPITZ, W. U. (Ed.). . **Spitz and fisher's medicolegal investigation of death: guidelines for the application of pathology to crime investigation**. 3. ed. Springfield, Illinois: Charles C Thomas Pub Ltd, 2005. p. 71–117.

FLANAGAN, R. J.; AMIN, A.; SEINEN, W. Effect of post-mortem changes on peripheral and central whole blood and tissue clozapine and norclozapine

concentrations in the domestic pig (*Sus scrofa*). **Forensic Science International**, v. 132, n. 1, p. 9–17, 2003.

FLANAGAN, R. J.; CONNALLY, G.; EVANS, J. M. Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. **Toxicological Reviews**, v. 24, p. 63–71, 2005.

FLEISCHLI, M. A.; FRANSON, J. C.; THOMAS, N. J.; FINLEY, D. L.; RILEY JR., W. Avian mortality events in the United States caused by anticholinesterase pesticides: a retrospective summary of National Wildlife Health Center records from 1980 to 2000. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 542–550, 2004.

FORRESTER, M. B.; STANLEY, S. K. Patterns of animal poisonings reported to the Texas Poison Center Network: 1998-2002. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 46, p. 96–99, 2004.

FRANÇA, G. V. Introdução ao estudo da medicina legal. In: FRANÇA, G. V. (Ed.). . **Medicina legal**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011. p. 1–11.

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, ago. 1999.

GAILLARD, Y.; BREUIL, R.; DOCHE, C.; ROMEUF, L.; LEMEUR, C.; PREVOSTO, J. M.; FANTON, L. Detection of amitriptyline, nortriptyline and bromazepam in liver, CSF and hair in the homicidal poisoning of a one-month-old girl autopsied 8 months after death. **Forensic Science International**, v. 207, n. 1-3, p. e16–18, 2011.

GALLOWAY, T.; HANDY, R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology**, v. 12, n. 1-4, p. 345–363, 2003.

GAMMON, D. W.; LIU, Z.; BECKER, J. M. Carbofuran occupational dermal toxicity, exposure and risk assessment. **Pest Management Science**, v. 68, n. 3, p. 362–370, 2012.

GARTNER, K.; BUTTNER, D.; DOHLER, K.; FRIEDEL, R.; LINDENA, J.; TRAUTSCHOLD, I. Stress response of rats to handling and experimental procedures. **Laboratory Animals**, v. 14, n. 3, p. 267–274, 1980.

GERDIN, J. A.; MCDONOUGH, S. P. Forensic pathology of companion animal abuse and neglect. **Veterinary pathology**, 2013. completar a referencia, v., n. p.

GEROSTAMOULOS, D.; BEYER, J.; STAIKOS, V.; TAYLER, P.; WOODFORD, N.; DRUMMER, O. H. The effect of the postmortem interval on the redistribution of drugs: a comparison of mortuary admission and autopsy blood specimens. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 8, n. 4, p. 373–379, 2012.

GIADINIS, N. D.; RAIKOS, N.; LOUKOPOULOS, P.; MALLIARAKIS, E.; KARATZIAS, H. Carbamate poisoning in a dairy goat herd: clinicopathological

findings and therapeutic approach. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 6, p. 392–394, 2009.

GIBSON-CORLEY, K. N.; OLIVIER, A. K.; MEYERHOLZ, D. K. Principles for valid histopathologic scoring in research. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 1007–1015, 2013.

GIORDANO, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 500–508, 2005.

GRELLNER, W.; GLENEWINKEL, F. Exhumations: synopsis of morphological and toxicological findings in relation to the postmortem interval. Survey on a 20-year period and review of the literature. **Forensic Science International**, v. 90, n. 1-2, p. 139–159, 10 nov. 1997.

GRENDON, J.; FROST, F.; BAUM, L. Chronic health effects among sheep and humans surviving an aldicarb poisoning incident. **Veterinary and Human Toxicology**, 1994. completar a referencia, v. n. p.

GUNASEKERA, R. S.; COSTAS, E. H.; BROWN, A. B. Tales from the grave: Opposing autopsy reports from a body exhumed. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, 2012. completar a referencia, v. n. p.

GUPTA, R. C. Carbofuran toxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, n. 4, p. 383–418, 1994.

GUPTA, R. C.; MILATOVIC, D.; DETTBARN, W. D. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. **Neurotoxicology**, v. 22, n. 2, p. 271–282, 2001.

HAN, E.; KIM, E.; HONG, H.; JEONG, S.; KIM, J.; IN, S.; CHUNG, H.; LEE, S. Evaluation of postmortem redistribution phenomena for commonly encountered drugs. **Forensic Science International**, v. 219, n. 1-3, p. 265–271, 2012.

HARABAWY, A. S.; IBRAHIM, A. T. Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): hematological, biochemical and cytogenetic response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 103, p. 61–67, 2014.

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.

HENSSGE, C.; MADEA, B. Estimation of the time since death. **Forensic Science International**, v. 165, p. 182–184, 2007.

HERBRANDSON, C.; BRADBURY, S. P.; SWACKHAMER, D. L. Influence of suspended solids on acute toxicity of carbofuran to *Daphnia magna*: II. An evaluation of potential interactive mechanisms. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 343–355, 2003.

HILBERG, T.; BUGGE, A.; BEYLICH, K. M.; INGUM, J.; BJORNEBOE, A.; MORLAND, J. An animal model of postmortem amitriptyline redistribution. **Journal of Forensic Science**, v. 38, n. 1, p. 81–90, 1993.

HILBERG, T.; BUGGE, A.; BEYLICH, K. M.; MORLAND, J.; BJORNEBOE, A. Diffusion as a mechanism of postmortem drug redistribution: an experimental study in rats. **International Journal of Legal Medicine**, v. 105, n. 2, p. 87–91, 1992.

HILBERG, T.; RIPEL, A.; SLORDAL, L.; BJORNEBOE, A.; MORLAND, J. The extent of postmortem drug redistribution in a rat model. **Journal of Forensic Science**, v. 44, n. 5, p. 956–962, 1999.

HILBERG, T.; ROGDE, S.; MORLAND, J. Postmortem drug redistribution--human cases related to results in experimental animals. **Journal of Forensic Sciences**, v. 44, n. 1, p. 3–9, 1999.

HILL, R. C.; VAN WINKLE, T. J. Acute necrotizing pancreatitis and acute suppurative pancreatitis in the cat. A retrospective study of 40 cases (1976-1989). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 1, p. 25–33, 1993.

HOFFMANN, U.; HECKER, U.; ABEL, P. Acute poisoning by pirimicarb: clinical and toxicological features. **Clinical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 694–696, 2008.

IBRAHIM, A. T.; HARABAWY, A. S. Sublethal toxicity of carbofuran on the African catfish *Clarias gariepinus*: hormonal, enzymatic and antioxidant responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 106, p. 33–39, 2014.

INDIRA, M.; ANDREWS, M. A.; RAKESH, T. P. Incidence, predictors, and outcome of intermediate syndrome in cholinergic insecticide poisoning: a prospective observational cohort study. **Clinical Toxicology**, v. 51, n. 9, p. 838–845, 2013.

JUNG, Y. S.; KIM, C. S.; PARK, H. S.; SOHN, S.; LEE, B. H.; MOON, C. K. H.; LEE, S. H.; BAIK, E. J.; MOON, C. K. H. N-nitrosocarbofuran induces apoptosis in mouse brain microvascular endothelial cells (bEnd.3). **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 93, n. 4, p. 489–495, 2003.

KÄFERSTEIN, H.; STICHT, G.; MADEA, B. Chlorprothixene in bodies after exhumation. **Forensic Science International**, v. 229, n. 1-3, p. e30–4, 10 jun. 2013.

KALARIA, R. N.; HOMAYOUN, P.; WHITEHOUSE, P. J. Nicotinic cholinergic receptors associated with mammalian cerebral vessels. **Journal of the Autonomical Nervous System**, v. 49, p. S3–7, 1994.Suppl.

KARAMI-MOHAJERI, S.; ABDOLLAHI, M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. **Human and Experimental Toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1119–1140, 2011.

KESSE, W. K.; PARKER, T. L.; COUPLAND, R. E. The innervation of the adrenal gland. I. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the rat adrenal gland. **Journal of Anatomy**, v. 157, p. 33–41, 1988.

KHAN, S. A. Differential diagnosis of common acute toxicologic versus nontoxicologic illness. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 2, p. 389–402, ix, 2012.

KOKO, V.; DJORDJEVIAE, J.; CVIJIAE, G.; DAVIDOVIAE, V. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. Pt 24, p. 4225–4230, 2004.

KUMAR, L.; AGARWAL, S. S.; CHAVALI, K. H.; MESTRI, S. C. Homicide by organophosphorus compound poisoning: a case report. **Medicine, Science and the Law**, v. 49, n. 2, p. 136–138, 2009.

LANKISCH, P. G.; RAHLF, G.; KOOP, H. Pulmonary complications in fatal acute hemorrhagic pancreatitis. **Digestive diseases and sciences**, v. 28, p. 110–116, 1983.

LECH, T. Exhumation examination to confirm suspicion of fatal lead poisoning. **Forensic Science International**, v. 158, n. 2-3, p. 219–223, 2006.

LEE, A. S. Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 267–273, 1992.

LEIBSON, T.; LIFSHITZ, M. Organophosphate and carbamate poisoning: review of the current literature and summary of clinical and laboratory experience in southern Israel. **The Israel Medical Association Journal : IMAJ**, v. 10, p. 767–770, 2008.

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

MACFARLANE, E.; SIMPSON, P.; BENKE, G.; SIM, M. R. Suicide in Australian pesticide-exposed workers. **Occupational Medicine (Oxford, England)**, v. 61, n. 4, p. 259–64, jun. 2011.

MADEA, B. Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry. **Forensic Science International**, v. 151, p. 139–149, 2005.

MAHDI, A.; VAN DER MERWE, D. Dog and cat exposures to hazardous substances reported to the kansas state veterinary diagnostic laboratory: 2009-2012. **Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology**, v. 9, p. 207–211, 2013.

MANSFIELD, C. S.; JONES, B. R. Review of feline pancreatitis part one: the normal feline pancreas, the pathophysiology, classification, prevalence and aetiologies of pancreatitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, n. 3, p. 117–124, 2001.

- MARAN, E.; FERNANDEZ, M.; BARBIERI, P.; FONT, G.; RUIZ, M. J. Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 3, p. 922–930, 2009.
- MARLET, E. F.; MAIORKA, P. C. Retrospective analyzes of cruelty toward dogs and cats in the city of Sao Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, p. 385–394, 2010.
- MARLET, E. F.; MAIORKA, P. C. O Ensino de medicina legal no Brasil. **Revista CFMV**, v. 55, p. 7–11, 2012.
- MARLET, E. F.; YOSHIDA, A. S.; GÓRNIK, S. L.; MAIORKA, P. C. Elaboração de laudo pericial em medicina veterinária. **Revista CFMV**, v. 55, n. 12-19, 2012.
- MARRS, T. C.; MAYNARD, R. L. Neurotransmission systems as targets for toxicants: a review. **Cell Biology and Toxicology**, v. 29, n. 6, p. 381–396, 2013.
- MCEWEN, B. J. Trends in domestic animal medico-legal pathology cases submitted to a veterinary diagnostic laboratory 1998-2010. **Journal of Forensic Sciences**, v. 57, n. 5, p. 1231–1233, set. 2012.
- MCINTYRE, I. M. Liver and peripheral blood concentration ratio (L/P) as a marker of postmortem drug redistribution: a literature review. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 10, n. 1, p. 91–96, 2014.
- MELITO, A. L.; FLORIO, J. C. Detecção e quantificação de aldicarb por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a detector UV em amostras de sangue de cães. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 19, n. 2, p. 95–101, 2006.
- MERCK, M. D. **Veterinary forensics: animal cruelty investigations**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2012a. p. 424
- MERCK, M. D. Crime scene investigation. In: MERCK, M. D. (Ed.). **Veterinary forensics: animal cruelty investigations**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012b. p. 19–30.
- MILATOVIC, D.; GUPTA, R. C.; ASCHNER, M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. **Scientific World Journal**, v. 6, p. 295–310, 2006.
- MILATOVIC, D.; GUPTA, R. C.; DEKUNDY, A.; MONTINE, T. J.; DETTBARN, W. D. Carbofuran-induced oxidative stress in slow and fast skeletal muscles: prevention by memantine and atropine. **Toxicology**, v. 208, n. 1, p. 13–24, 2005.
- MILATOVIC, D.; ZIVIN, M.; GUPTA, R. C.; DETTBARN, W. D. Alterations in cytochrome c oxidase activity and energy metabolites in response to kainic acid-induced status epilepticus. **Brain Research**, v. 912, n. 1, p. 67–78, 2001.
- MILLS, G. Proving the crime: how veterinary forensics can help. **The Veterinary Record**, v. 172, n. 18, p. 465–466, 4 maio 2013.

MIRZA, F. H.; ADIL, S. E.; MEMON, A. A.; ALI PARYAR, H. Exhumation - Nuisance to the dead, justified? **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 19, n. 6, p. 337–340, 2012.

MOLINA, D. K.; WOOD, L. E.; FROST, R. E. Is routine histopathologic examination beneficial in all medicolegal autopsies? **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology : Official Publication of The National Association of Medical Examiners**, v. 28, p. 1–3, 2007.

MONTESISSA, C.; HUVEENEERS, M. B.; HOOGENBOOM, L. A.; 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, p. 127–138, 1994.

MORITZ, F.; DROY, J. M.; DUTHEIL, G.; MELKI, J.; BONMARCHAND, G.; LEROY, J. Acute pancreatitis after carbamate insecticide intoxication. **Intensive Care Medicine**, v. 20, n. 1, p. 49–50, 1994.

MORIYA, F.; HASHIMOTO, Y. Redistribution of basic drugs into cardiac blood from surrounding tissues during early-stages postmortem. **Journal of Forensic Science**, v. 44, n. 1, p. 10–16, 1999.

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, n. 2, p. 94–106, 1999.

MOTAS-GUZMÁN, M.; MARLA-MOJICA, P.; ROMERO, D.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J. Intentional poisoning of animals in southeastern Spain: a review of the veterinary toxicology service from Murcia, Spain. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, p. 47–50, 2003.

MUDIAM, M. K.; CH, R.; SAXENA, P. N. Gas chromatography-mass spectrometry based metabolomic approach for optimization and toxicity evaluation of earthworm sub-lethal responses to carbofuran. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81077, 2013.

MUNRO, R. Forensic Necropsy. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 7, n. 4, p. 201–209, 1998.

MUNRO, R.; MUNRO, H. M. C. Some challenges in forensic veterinary pathology: a review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, n. 1, p. 57–73, jul. 2013.

NELSON, L. S.; PERRONE, J.; DEROOS, F.; STORK, C.; HOFFMAN, R. S. Aldicarb poisoning by an illicit rodenticide imported into the United States: tres pasitos. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, v. 39, n. 5, p. 447–452, 2001.

NEWBERY, S.; MUNRO, R. Forensic veterinary medicine: 1. investigation involving live animals. **In Practice**, 2011. completar v. n. p.

NISSE, P.; DEVEAUX, M.; TELLART, A. S.; DHERBECOURT, V.; PEUCELLE, D.; MATHIEU-NOLF, M. Intoxications par l'aldicarbe : revue des cas survenus dans le

nord de la france entre 1998 et 2001. **Acta Clinica Belgica**, v. 57, p. 12–15, 2002. Suppl 1.

NOVOTNÝ, L.; MISÍK, J.; HONZLOVÁ, A.; CHLOUPEK, P.; KUČA, K.; VÁVRA, O.; RACHAČ, V.; ONDRÁČEK, P. Incidental poisoning of animals by carbamates in the Czech Republic. **Journal of Applied Biomedicine**, 2011a. completar v. n. p.

OGUT, S.; GULTEKIN, F.; KISIOGLU, A. N.; KUCUKONER, E. Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n. 9, p. 820–825, 2011.

OMALU, B. I.; MANCUSO, J. A.; CHO, P.; WECHT, C. H. Diagnosis of Alzheimer's disease in an exhumed decomposed brain after twenty months of burial in a deep grave. **Journal of Forensic Sciences**, v. 50, n. 6, p. 1453–1458, nov. 2005.

OTIENO, P. O.; LALAH, J. O.; VIRANI, M.; JONDIKO, I. O.; SCHRAMM, K.-W. Carbofuran and its toxic metabolites provide forensic evidence for furadan exposure in vultures (*Gyps africanus*) in Kenya. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, p. 536–544, 2010.

PASCOE, W. S.; SMYTHE, G. A.; STORLIEN, L. H. Enhanced responses to stress induced by fat-feeding in rats: relationship between hypothalamic noradrenaline and blood glucose. **Brain Research**, v. 550, n. 2, p. 192–196, 1991.

PELEKIS, M.; EMOND, C. Physiological modeling and derivation of the rat to human toxicokinetic uncertainty factor for the carbamate pesticide aldicarb. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 179–191, 2009.

PETERSON, J. L.; HICKMAN, M. J.; STROM, K. J.; JOHNSON, D. J. Effect of forensic evidence on criminal justice case processing. **Journal of Forensic Sciences**, v. 58, p. S78–90, 2013.

PETTERINO, C.; PAOLO, B.; TRISTO, G. Clinical and pathological features of anticoagulant rodenticide intoxications in dogs. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 70–75, 2004.

POUNDER, D. J.; JONES, G. R. Post-mortem drug redistribution--a toxicological nightmare. **Forensic Science International**, v. 45, n. 3, p. 253–263, 1990.

PRANGNELL, J.; MCGOWAN, G. Soil temperature calculation for burial site analysis. **Forensic Science International**, v. 191, n. 1-3, p. 104–109, 30 out. 2009.

PROENÇA, P.; TEIXEIRA, H.; DE MENDONÇA, M. C.; CASTANHEIRA, F.; MARQUES, E. P.; CORTE-REAL, F.; NUNO VIEIRA, D. Aldicarb poisoning: one case report. **Forensic Science International**, v. 146, p. S79–81, 2 dez. 2004. Suppl.

QUINTANA, M. **Caderno H.** 4. ed. Rio de Janeiro: Globo, 2009. 104 p.

RAI, D. K.; RAI, P. K.; RIZVI, S. I.; WATAL, G.; SHARMA, B. Carbofuran-induced toxicity in rats: protective role of vitamin C. **Experimental Toxicology and Pathology**, v. 61, n. 6, p. 531–535, 2009.

RAMACHANDRAN, J.; PERALTA, E. G.; ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J. W.; SMITH, D. H.; CAPON, D. J. Structural and functional diversity of muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 289, p. 327–339, 1989.

RANDALL, B. B.; FIERRO, M. F.; FROEDE, R. C. Practice guideline for forensic pathology. Members of the Forensic Pathology Committee, College of American Pathologists. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 122, p. 1056–1064, 1998.

RAO, D. B.; LITTLE, P. B.; MALARKEY, D. E.; HERBERT, R. A.; SILLS, R. C. Histopathological evaluation of the nervous system in National Toxicology Program rodent studies: a modified approach. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 3, p. 463–470, 2011.

REBELO, F. M.; CALDAS, E. D.; HELIODORO, V. DE O.; REBELO, R. M. [Intoxication due to pesticides in the Federal District of Brazil between 2004 and 2007 -analysis of notification to the Toxicological Information and Assistance Center]. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3493–3502, ago. 2011.

REICHENHEIM, M. E.; MORAES, C. L.; SZKLO, A.; HASSELMANN, M. H.; SOUZA, E. R. DE; LOZANA, J. DE A.; FIGUEIREDO, V. The magnitude of intimate partner violence in Brazil: portraits from 15 capital cities and the Federal District. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 2, p. 425–437, fev. 2006.

RISHER, J. F.; MINK, F. L.; STARA, J. F. The toxicologic effects of the carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. **Environmental Health Perspectives**, v. 72, p. 267–281, jun. 1987.

RIZOS, E.; LIBEROPOULOS, E.; KOSTA, P.; EFREMIDIS, S.; ELISAF, M. Carbofuran-induced acute pancreatitis. **JOP : Journal of the Pancreas**, v. 5, n. 1, p. 44–47, jan. 2004.

RODGERS, K. The immunotoxicity of pesticides in rodents. **Human and Experimental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 111–113, 1995.

ROTH, A.; ZELLINGER, I.; ARAD, M.; ATSMON, J. Organophosphates and the heart. **Chest**, v. 103, n. 2, p. 576–582, 1993.

SAADEH, A. M.; FARSAKH, N. A.; AL-ALI, M. K. Cardiac manifestations of acute carbamate and organophosphate poisoning. **Heart**, v. 77, n. 5, p. 461–464, 1997.

SAAR, E.; BEYER, J.; GEROSTAMOULOS, D.; DRUMMER, O. H. The time-dependant post-mortem redistribution of antipsychotic drugs. **Forensic Science International**, v. 222, n. 1-3, p. 223–227, 2012.

SAKUNTHALA TENNAKOON, D. A.; KARUNARATHNA, W. D.; UDUGAMPALA, U. S. Carbofuran concentrations in blood, bile and tissues in fatal cases of homicide and suicide. **Forensic Science International**, v. 227, n. 1-3, p. 106–110, 2013.

SALVAGNI, F. A.; SIQUEIRA, A.; MARIA, A. C. B. E.; MESQUITA, L. P.; MAIORKA, P.C. Patologia veterinária forense: aplicação, aspectos técnicos e relevância em casos com potencial jurídico de óbitos de animais. **Clínica Veterinária**, v. 112, p. 58–73, 2014.

SANCHEZ-BARBUDO, I. S.; CAMARERO, P. R.; MATEO, R. Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. **Science of Total Environment**, v. 420, p. 280–288, 2012

SATPAL; JAIN, S. K.; PUNIA, J. S. Studies on biochemical changes in subacute thiodicarb toxicity in rats. **Toxicology International**, v. 17, n. 1, p. 30–32, 2010.

SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K.; MURTHY, R. C. Comparative toxicity of carbaryl, carbofuran, cypermethrin and fenvalerate in *Metaphire posthuma* and *Eisenia fetida* - a possible mechanism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 218–225, 2014.

SHERMAN, M.; ROSS, E. Acute and subchronic toxicity to Japanese quail of the carbamate insecticides, carbofuran and SD 8530. **Poultry Science**, v. 48, n. 6, p. 2013–2018, 1969.

SINCLAIR, L.; LOCKWOOD, R. Cruelty Towards Cats. In: AUGUST, J. R. (Ed.). . **Consultations in feline internal medicine**. 5th. ed. [s.l.] Saunders, 2005. p. 800.

SINCLAIR, L.; MERCK, M.; LOCKWOOD, R. **Forensic investigation of animal cruelty**: a guide for veterinary and law enforcement professionals. [s.l.] Humane Society Press, 2006. p. 268

SINGH, R. K.; SINGH, R. L.; SHARMA, B. Acute toxicity of Carbofuran to a Freshwater Teleost, *Clarias batrachus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 6, p. 1259–1263, 2003.

SINGH, S.; BHARDWAJ, U.; VERMA, S. K.; BHALLA, A.; GILL, K. Hyperamylasemia and acute pancreatitis following anticholinesterase poisoning. **Human and Experimental Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 467–471, 2007

SIQUEIRA, A.; CASSIANO, F. C.; MAIORKA, P. C. Maus tratos contra gatos domésticos. **Clínica Veterinária**, v. 95, p. 70–78, 2011.

SKOPP, G. Postmortem toxicology. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 6, p. 314–325, 2010.

SPENNEMANN, D. H.; FRANKE, B. Archaeological techniques for exhumations: a unique data source for crime scene investigations. **Forensic Science International**, v. 74, n. 1-2, p. 5–15, 1995.

SPILLER, H. A.; PFIEFER, E. Two fatal cases of selenium toxicity. **Forensic Science International**, v. 171, n. 1, p. 67–72, 2007.

STARKIE, A.; WHITE, L.; THOMPSON, T. An investigation into the effects of decomposition on the post-mortem location of trans-dermal artefacts. **Forensic Science International**, v. 224, n. 1-3, p. 68–72, 2013.

STEVENS, H. M. The stability of some drugs and poisons in putrefying human liver tissues. **Journal of the Forensic Science Society**, v. 24, n. 6, p. 577–589, 1984.

THIEME, D.; PESCHEL, O.; FISCHER, F.; GRAW, M. Multi target analysis of putrefactive specimens by liquid chromatography-tandem mass spectrometry to prove multiple poisonings by hypnotics and muscle relaxants. **Drug Test Analysis**, v. 1, n. 4, p. 156–161, 2009.

TRAISH, A. M.; PALMER, M. S.; GOLDSTEIN, I.; MORELAND, R. B. Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. **Receptor**, v. 5, n. 3, p. 159–176, 1995.

TURNER, B.; WILTSHIRE, P. Experimental validation of forensic evidence: a study of the decomposition of buried pigs in a heavy clay soil. **Forensic Science International**, v. 101, n. 2, p. 113–122, 26 abr. 1999.

VAN GESTEL, C. A. Validation of earthworm toxicity tests by comparison with field studies: a review of benomyl, carbendazim, carbofuran, and carbaryl. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 23, n. 2, p. 221–236, 1992.

VOCCIA, I.; BLAKLEY, B.; BROUSSEAU, P.; FOURNIER, M. Immunotoxicity of pesticides: a review. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, n. 1-2, p. 119–132, 1999.

VOS, J. G.; KRAJNC, E. I. Immunotoxicity of pesticides. **Developments in Toxicology and Environmental Science**, v. 11, p. 229–240, 1983.

WADDELL, L. S.; POPPENG, R. H.; DROBATZ, K. J. Anticoagulant rodenticide screening in dogs: 123 cases (1996-2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 4, p. 516–521, 2013.

WANG, G.-J. Acute pancreatitis: Etiology and common pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 12, p. 1427, 2009.

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

WILSON, A. S.; JANAWAY, R. C.; HOLLAND, A. D.; DODSON, H. I.; BARAN, E.; POLLARD, A. M.; TOBIN, D. J. Modelling the buried human body environment in upland climes using three contrasting field sites. **Forensic Science International**, v. 169, n. 1, p. 6–18, 14 jun. 2007.

WYMAN, J. F. Principles and procedures in forensic toxicology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, p. 493–507, 2012.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; FLÓRIO, J. C.; SPINOSA, H. S. Thin-layer chromatography for aldicarb poisoning diagnosis in dogs and cats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1231–1235, out. 2007.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. S. Fatal poisoning in dogs and cats—A 6-year report in a veterinary pathology service. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 304–309, 2007b.

XAVIER, F.; RIGHI, D.; SPINOSA, H. Aldicarb toxicology: general, clinic and therapeutic features in dogs and cats. **Ciência Rural**, p. 1206–1211, 2007c.

XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M. Current concepts in feline pancreatitis. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 23, n. 4, p. 185–192, 2008.

YAVUZ, T.; DELIBAS, N.; YILDIRIM, B.; ALTUNTAS, I.; CANDIR, O.; CORA, A.; KARAHAN, N.; IBRISIM, E.; KUTSAL, A. Vascular wall damage in rats induced by organophosphorus insecticide methidathion. **Toxicology Letters**, v. 155, n. 1, p. 59–64, 2005.

YOON, J. Y.; OH, S. H.; YOO, S. M.; LEE, S. J.; LEE, H. S.; CHOI, S. J.; MOON, C. K.; LEE, B. H. N-nitrosocarbofuran, but not carbofuran, induces apoptosis and cell cycle arrest in CHL cells. **Toxicology**, v. 169, n. 2, p. 153–161, 2001.

YOSHIDA, A. S.; SIQUEIRA, A.; MAIORKA, P. C. Importância do Médico Veterinário no Levantamento de Provas em Crimes de Maus Tratos. **Revista CFMV**, v. 63, p. 55–60, 2014.

ZHOU, L.; LIU, L.; CHANG, L.; LI, L. Poisoning deaths in Central China (Hubei): A 10-year retrospective study of forensic autopsy cases. **Journal of Forensic Sciences**, v. 56 Suppl 1, p. S234–237, 2011.