



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS VETERINÁRIAS

**ATIVIDADE DE COLINESTERASE SÉRICA EM CÃES ANTES E
DURANTE O USO DE COLEIRA IMPREGNADA COM AGENTE
ANTICOLINESTERÁSICO**

Autora:
Renata de Oliveira Saccaro

Orientadora:
Dra. Eliane Dallegrave

Porto Alegre
2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS VETERINÁRIAS

**ATIVIDADE DE COLINESTERASE SÉRICA EM CÃES ANTES E
DURANTE O USO DE COLEIRA IMPREGNADA COM AGENTE
ANTICOLINESTERÁSICO**

Autora:
Renata de Oliveira Saccaro
**Monografia apresentada à Faculdade
de Veterinária como requisito parcial
para obtenção do grau de Especialista
em Análises Clínicas Veterinárias**

Orientadora:
Dra. Eliane Dallegrave

Porto Alegre
2007

RESUMO

Os agentes anticolinesterásicos organofosforados e carbamatos, largamente utilizados como ectoparasiticidas em animais domésticos, são responsáveis por vários casos de intoxicação. Em medicina veterinária, ainda não se utiliza a atividade da colinesterase como método diagnóstico de rotina, sendo este apenas realizado através dos sinais clínicos e resposta ao tratamento. O presente trabalho visa avaliar as possíveis alterações na atividade da butirilcolinesterase sérica de 10 cães machos adultos, hígdos, sem raça definida, antes do uso de coleira impregnada com o agente anticolinesterásico diazinon e 7, 60 e 120 dias após. O valor encontrado como média na pré-medida foi 3169 U/L com desvio padrão de 974 U/L. A média e desvio padrão no dia 7 foi, respectivamente, 504 U/L e 167 U/L, no dia 60, 401 U/L e 67 U/L e no dia 120, 490 U/L e 215 U/L. Constatou-se intensa inibição da atividade enzimática, chegando a 17% da sua atividade no dia 7, com um pico de 14% no dia 60. Embora apresentando alterações acentuadas na atividade da butirilcolinesterase sérica, nenhum dos animais do presente estudo manifestou sinais clínicos compatíveis com um quadro de intoxicação.

Palavras-chave: atividade de colinesterase, acetilcolina, organofosforado, diazinon, cães.

ABSTRACT

The anticholinesterase compounds organophosphate and carbamate are widely used in ectoparasite control in domestic animals being responsible for many cases of intoxication. In veterinary medicine the cholinesterase activity is not commonly used as a diagnostic method. The diagnosis is based on clinical signs and response to treatment. The present report evaluates butirilcholinesterase activity changes in ten adult mixed breed male healthy dogs before using a collar containing diazinon and 7, 60 and 120 days after. The mean value for the first measurement was 3169 U/L with a standard deviation of 974 U/L. The values for the day 7 were respectively 504 U/L and 167 U/L; day 60 were 401 U/L and 67 U/L; day 120 were 490 U/L and 215 U/L. High inhibition was found reaching 17% of the basal enzyme activity on day 7, with a peak of 14% on day 60. Despite the alteration on enzymatic activity was significant, no clinical sings of intoxication were noticed in any of the dogs participating on this research.

Key words: cholinesterase activity, acetylcholine, diazinon, organophosphate, dogs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exposição humana a organofosforados e carbamatos, registradas no CIT/RS em 2005	16
Tabela 2	Intensidade dos sinais de intoxicação pelo organofosforado Paraoxon em ratos Wistar	18
Tabela 3	Valores hematológicos e bioquímicos mínimos e máximos encontrados no dia 0	25
Tabela 4	Valores séricos mínimos e máximos de ALT e creatinina encontrados nos dias 7, 60 e 120	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmula química da acetilcolina	10
Figura 2	Atividade da butirilcolinesterase sérica individual de cães machos adultos, antes e após 7, 60 e 120 dias do uso de coleira impregnada com diazinon	26
Figura 3	Atividade da butirilcolinesterase sérica média de cães machos adultos, antes e após 7, 60 e 120 dias do uso de coleira impregnada com diazinon	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	alanina amino transferase
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CIT	Centro de Informação Toxicológica
DTNB	ácido 5,5 ditiobis 2 nitrobenzoico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
FA	fosfatase alcalina
M	Mol
PPT	Proteína plasmática total
rpm	rotações por minuto
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	ultra violeta
VCM	Volume corpuscular médio
2-PDS	2,2' ditiopiridina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	09
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	Fisiologia do sistema nervoso autônomo	10
2.2	Acetilcolina	10
2.3	Tipos de colinesterases	11
2.4	Agentes anticolinesterásicos	13
2.4.1	Mecanismos de ação	13
2.4.2	Efeitos dos agentes anticolinesterásicos	13
2.4.3	Classificação dos agentes anticolinesterásicos	14
2.4.3.1	Carbamatos	14
2.4.3.2	Organofosforados	15
3.	INTOXICAÇÃO POR AGENTES ANTICOLINESTERÁSICOS	16
3.1	Epidemiologia	16
3.2	Sinais clínicos	17
3.3	Tratamento	17
4	DIAGNÓSTICO DE INTOXICAÇÃO PELA MEDIDA DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE	19
4.1	Métodos analíticos	21
5	MATERIAL E MÉTODO	24
5.1	Animais	24
5.2	Análises	24
6	DISCUSSÃO	28
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
	REFERÊNCIAS	31
	APÊNDICE A - Questionário epidemiológico	33
	APÊNDICE B - Valores hematológicos e bioquímicos no dia 0	34
	APÊNDICE C - Valores de colinesterase e bioquímica nos dias 0, 7, 60 e 120	39

1 INTRODUÇÃO

Os agentes anticolinesterásicos, também chamados de agentes colinérgicos de ação indireta, atuam através da inibição da enzima colinesterase, responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina, prolongando a ação deste nos terminais nervosos. São classificados como carbamatos, inibidores de ação reversível e organofosforados, de ação irreversível. Estes agentes são largamente utilizados em medicina veterinária, na formulação de produtos contra ectoparasitos, como pulgas e carrapatos. O mau uso, intencional ou não, destes produtos causa intoxicações em animais e no homem, podendo levar a morte.

Na maioria dos casos em medicina veterinária, o diagnóstico é feito através da história, sinais clínicos e resposta ao tratamento com atropina. Embora ainda seja pouco utilizada, a medida da atividade de colinesterase pode representar uma ferramenta importante como auxílio neste diagnóstico. No entanto, o profissional que irá utilizar este dado deve ter conhecimento das suas variações, para evitar interpretações equivocadas. Além disso, ainda restam algumas dúvidas a respeito do comportamento da colinesterase, que precisam ser elucidadas.

O presente trabalho reúne informações sobre este método diagnóstico, com o intuito de familiarizar os clínicos e tornar este recurso mais presente na rotina da medicina veterinária. Ainda descreve um experimento que mede a atividade da butirilcolinesterase de cães machos adultos antes do uso de coleiras antiparasitárias contendo o organofosforado diazinon e acompanha os níveis desta atividade enzimática após 7, 60 e 120 dias da utilização das coleiras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia do sistema nervoso autônomo

O sistema nervoso autônomo, também chamado visceral, vegetativo ou involuntário, tem função de regular as atividades respiratória, circulatória e digestória, controlar temperatura corporal, metabolismo, sudorese e secreção de glândulas endócrinas. É formado por centros de controle no sistema nervoso central, gânglios, plexos nervosos e rede periférica de fibras aferentes e eferentes. As fibras eferentes do sistema nervoso autônomo são divididas em porção simpática (toracolombar ou adrenérgica) e parassimpática (craniosacral ou colinérgica). O sistema nervoso autônomo simpático tem sua intensidade de atividade variável em função do momento, com finalidade de adaptar o organismo a situações que se modificam, como em estresse e medo. O sistema nervoso autônomo parassimpático está associado à conservação de energia e manutenção das funções orgânicas em períodos de atividade mínima. Estes dois sistemas são formados por neurônios pré e pós-ganglionares. A acetilcolina é o neurotransmissor liberado pelas fibras simpáticas pré-ganglionares e parassimpáticas pré e pós-ganglionares. As fibras simpáticas pós-ganglionares têm como neurotransmissor a noradrenalina (FANTONI, 2002). A acetilcolina ainda atua como neurotransmissor em receptores pré e pós sinápticos no sistema nervoso central e receptores pós juncionais da placa neuromuscular (SPINOSA, 2002).

2.2 Acetilcolina

É um neurotransmissor, agonista colinérgico, sintetizado pela colina acetiltransferase a partir da colina e acetilcoenzima A. (AHRENS, 1997) É sintetizada no interior das vesículas dos neurônios, principalmente nas terminações axonais. (MORAES, 1999). A acetilcolina é uma amina terciária, possuindo um átomo de nitrogênio carregado positivamente (SPINOSA, 2002).



Figura 1. Fórmula química da acetilcolina
Fonte: Kore, 1999

A chegada do potencial de ação na terminação nervosa faz com que a acetilcolina seja liberada, a partir das vesículas intracelulares onde se encontra estocada, por meio de exocitose, em um processo dependente de cálcio. Em seguida, a acetilcolina difunde-se pela fenda sináptica e interage com os receptores do corpo celular dos neurônios pós-ganglionares

(FANTONI, 2002). A ação despolarizante da acetilcolina demora poucos milissegundos, pois ela é rapidamente destruída pela enzima colinesterase (SWENSON, 1996).

Foram descritos dois tipos de receptores colinérgicos. O nicotínico é constituído por proteínas pentaméricas, formando um canal iônico, que é controlado por ligantes pelo mecanismo de portões. Sua ativação causa rápido aumento da permeabilidade celular ao sódio e cálcio, despolarização e excitação. Propõe-se atualmente dois subtipos: N1, presente no músculo esquelético e N2, presente nos gânglios e medula adrenal. Os receptores muscarínicos são designados de M1 a M5, sendo o M1 encontrado nos gânglios e em várias glândulas secretoras, o M2 no miocárdio, o M3 e M4 no músculo liso e em glândulas secretoras e o M5 no sistema nervoso central, assim como todos os citados anteriormente. (FANTONI, 2002) Os receptores muscarínicos parecem mediar os principais efeitos comportamentais associados à acetilcolina, principalmente efeitos sobre vigília, aprendizado e memória recente. (ANDRADE, 2002)

Os efeitos farmacológicos da acetilcolina são similares aos produzidos por estimulação vagal, redução da pressão sistêmica, estímulo dos receptores muscarínicos, aumentando a motilidade gastrointestinal e secreções (AHRENS, 1997). No músculo liso, promove aumento da contração muscular e relaxamento de esfíncteres de todo organismo. Este aumento da motilidade pode ser acompanhado de sinais clínicos como náuseas, eructações, vômitos, cólicas intestinais e defecação. No trato urinário, observa-se aumento da pressão miccional voluntária máxima e redução da capacidade vesical, além de relaxamento do trígono e esfíncter externo. Na musculatura brônquica, ocorre broncoconstrição e aumento da secreção das glândulas traqueobrônquicas. Não apenas nestas, mas observa-se aumento da secreção de todas as glândulas do organismo, como sudoríparas, lacrimais, salivares e de todo trato digestório. No sistema cardiovascular, ocorre vasodilatação, redução da frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo), diminuição da taxa de condução nos tecidos especializados dos nodos sinoatrial e atrioventricular e redução da força de contração cardíaca (efeito inotrópico negativo). No sistema nervoso central, a acetilcolina produz aumento de excitabilidade e podem ocorrer convulsões, embora, por possuir carga elétrica positiva, praticamente não atravesse a barreira hematoencefálica (SPINOSA, 2002).

2.3 Colinesterases

A acetilcolina é inativada por hidrólise pela ação da enzima acetilcolinesterase, com formação de colina e ácido acético. Os produtos da hidrólise são reutilizados para síntese de acetilcolina e acetilcoenzima, respectivamente (MORAES, 1999). Esta enzima, também

chamada de colinesterase verdadeira, específica ou eritrocitária, é encontrada nos dendritos, pericárdio e axônios dos neurônios colinérgicos (FANTONI, 2002). É sintetizada na eritropoiese, com renovação de 60 a 90 dias. Tem afinidade específica pela acetilcolina (MORAES, 1999). Segundo Tecles (2000), esta enzima hidrolisa acetilcolina e propionilcolina em velocidade semelhante, porém não tem ação sobre butirilcolina.

A butirilcolinesterase, pseudocolinesterase, esterase sérica, colinesterase inespecífica ou plasmática, também possui capacidade de degradar acetilcolina, porém hidrolisa vários ésteres (MORAES, 1999). A butirilcolinesterase hidrolisa butirilcolina em taxas maiores que propionilcolina e ainda age sobre acetilcolina, porém em baixa velocidade (TECLES, 2002); além de outros ésteres de colina, como succinilcolina e benzoilcolina (FURLANELLO, 2006). É encontrada em células gliais, no plasma e fígado. Seu papel fisiológico ainda não foi totalmente esclarecido (FANTONI, 2002). Sua síntese ocorre no fígado e sua renovação a cada 30 a 60 dias (MORAES, 1999).

Estas enzimas pertencem à família das hidrolases da serina (ANDRADE, 2002). A redução na atividade enzimática pode estar relacionada com ação de inibidores, biossíntese reduzida ou variações genéticas disfuncionais. Assim, alterações enzimáticas devem ser relacionadas aos níveis basais do paciente, devido a grande variação individual e, ainda, relacionada à metodologia empregada (TRUNDLE, 1988).

Segundo Moraes (1999), as variações individuais ficam em torno de 15% e se devem a fatores variados, como idade, sexo e raça, sendo, de uma forma geral, as fêmeas mais susceptíveis a inibidores de colinesterase e mulheres jovens apresentarem níveis de colinesterase plasmática inferiores a homens. O estado nutricional também interfere, ocorrendo maior toxicidade oral por praguicidas em animais alimentados com dieta deficiente em proteínas. Em mulheres, ocorre redução na atividade da colinesterase durante o período menstrual e várias alterações durante a gestação. Várias enfermidades também podem alterar esta enzima, elevando-a ou reduzindo-a. Desidratação, úlceras intestinais, pancreatite, alguns tipos de câncer, infartos, infecções e anemia reduzem a atividade da colinesterase plasmática. Já diabetes, hipertensão, nefropatia e artrite podem elevar sua atividade. Várias drogas, como barbitúricos, fisostigmina, carbamatos, organofosforados, fenotiazínicos, atropina, escopolamina, streptomina, cloranfenicol, hormônios estrogênicos e derivados de cortisona e albumina, alteram a atividade da enzima. Segundo estudo realizado por Bareggi (1978), clorpromazina aumenta a atividade da acetilcolinesterase em cães, aumentando o metabolismo da acetilcolina. Ainda, o fumo reduz a atividade da colinesterase plasmática.

Os eritrócitos mais velhos apresentam atividade de colinesterase mais baixas que os jovens. Os níveis de acetilcolinesterase aumentam com a idade, ao mesmo tempo em que os níveis de colina acetiltransferase diminuem (GOLDSTON, 1999). Estudo realizado por Kolf-Clauw (2000), mostra que a atividade desta enzima encontra-se significativamente baixa em cães com menos de 1 ano de idade.

Ainda, são observadas variações significativas entre indivíduos clinicamente normais, que se devem a vários fatores, como estado reprodutivo, clima, estação do ano, diferenças genéticas, variações diárias, estado de saúde, variações nos sistemas genéticos de controle da síntese de colinesterase (FURLANELLO, 2006).

2.4 Agentes anticolinesterásicos

2.4.1 Mecanismos de Ação

Também chamados de agentes colinérgicos de ação indireta, prolongam o tempo de permanência da acetilcolina nos terminais nervosos, por inibição da acetilcolinesterase (FANTONI, 2002).

Estes agentes atuam, indiretamente, prevenindo a hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase por três mecanismos:

1. inibição da acetilcolinesterase reversível: o nitrogênio quaternário da droga se liga ao centro ativo da enzima, no sítio aniônico;

2. carbamilação da acetilcolinesterase: substratos da acetilcolinesterase ocupam o sítio ativo por um período maior de tempo, permitindo aumento da concentração de acetilcolina nas sinapses;

3. fosforilação da acetilcolinesterase: formam ligação covalente estável com a enzima e seus efeitos são de longa duração (ARHENS, 1997).

2.4.2 Efeitos

Seus efeitos se devem à:

- Superestimulação muscarínica: sialorréia, lacrimejamento, secreção nasal, bradicardia, diminuição do débito cardíaco e da pressão arterial, miose, sudorese, tosse, vômito, micção freqüente, aumento da motilidade intestinal e broncoconstrição (ANDRADE, 2002). No sistema respiratório, ocorre dispnéia e respiração ruidosa. Os efeitos cardiovasculares são complexos, refletindo efeitos ganglionares e pós ganglionares do acúmulo de acetilcolina sobre coração e vasos. Há tendência de predomínio do tônus do SNA parassimpático, levando

a bradicardia e vasodilatação, porém, devido a mecanismos compensatórios, podem ocorrer taquicardia e vasoconstricção. Ainda, a liberação de acetilcolina na adrenal promove liberação de noradrenalina/adrenalina, responsáveis pelo predomínio do tônus do SNA simpático (SPINOSA, 2002).

- Superestimulação nicotínica: fasciculações musculares, tremores, convulsões, espasmos, hipertonicidade, com marcha e postura rígida. Com o aumento da estimulação nicotínica, ocorre bloqueio neuromuscular do tipo despolarizante, resultando em paralisia muscular (ANDRADE, 2002). Alguns organofosforados podem desencadear desmielinização, levando a fraqueza muscular e perda sensorial (SPINOSA, 2002).

- Efeitos no sistema nervoso central: inquietação, tontura, depressão circulatória e respiratória, coma e morte (ANDRADE, 2002). Os compostos terciários, como fisostigmina e organofosforados apolares, atravessam a barreira hematoencefálica, produzindo excitação, convulsões, seguidas de depressão intensa com perda de consciência e insuficiência respiratória (SPINOSA, 2002).

2.4.3 Classificação

Podem ser classificados em dois grupos:

2.4.3.1 Carbamatos:

São inibidores reversíveis das colinesterases, agentes de curta duração. Apresentam uma ligação carbamila-éster que é lentamente hidrolisada pela enzima, promovendo a carbamilação da colinesterase, formando ácido carbâmico. Os carbamatos se ligam tanto no sítio aniônico como esterásico da acetilcolinesterase. Estes apresentam, também, propriedade agonista, produzem dessensibilização e bloqueio do canal do receptor nicotínico. Os carbamatos são compostos hidrossolúveis (ANDRADE, 2002).

Podem ser empregados como adjuvantes em procedimentos anestésicos (FANTONI, 2002), em tratamentos como o de glaucoma, intoxicação por atropina, íleo paralítico, atonia de bexiga, miastenia gravis, e ainda, como inseticidas (AHRENS, 1997).

São exemplos: fisostigmina (droga lipofílica, que atravessa a barreira hematoencefálica e produz efeitos no SNC, é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, tecido subcutâneo e mucosas); neostigmina, piridostigmina e ambedônio (apresentam dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica, têm ação nicotínica nos músculos esqueléticos, não são bem absorvidas por via oral); edrofônio (agente de curta duração); carbaril (utilizado em

produtos de jardinagem, apresentam baixa toxicidade por absorção dérmica); demecário (SPINOSA, 2002), propoxur (AHRENS, 1997).

Segundo Andrade (2002), edrofônio e ambenônio não são classificados como carbamatos, são amônias mono e biquaternárias, inibidores reversíveis de ação curta, ligam-se ao local aniônico da acetilcolinesterase, enquanto os carbamatos apresentam ação média.

2.4.3.2 Organofosforados:

São inibidores irreversíveis, devido à formação de complexos estáveis com as colinesterases, apresentando longa duração. Produzem fosforilação do sítio esterásico da acetilcolinesterase, formando uma ligação co-valente bastante estável. Alguns organofosforados ligam-se em ambos os sítios ativos da enzima. A maioria destes consiste em líquido lipossolúvel, volátil, rapidamente absorvido por pele, mucosas, trato digestório e respiratório. Essas substâncias podem depositar-se em tecido adiposo e retornar a circulação posteriormente (SPINOSA, 2002).

Incluem agentes usados em guerra química (tabum, sarim, somam), praguicidas, domisanitários e medicamentos anti-helmínticos. São exemplos, paration (principal responsável por envenenamento acidental e óbito do grupo, torna-se ativo após biotransformação a paraoxon); malation (usado em preparados dermatológicos no tratamento da pediculose e como praguicida); ecotiofato (não é volátil e não penetra na pele com facilidade, tem utilidade clínica no tratamento do glaucoma) (SPINOSA, 2002), coumafós, fention, clorpirifós, diazinon, pirimifós, diclorfós, triclorfono, utilizados como inseticidas, no controle de pulgas, piolhos e carrapatos em cães e gatos, ou como anti-helmínticos de largo espectro. (AHRENS, 1997).

3 INTOXICAÇÃO POR AGENTES ANTICOLINESTERÁSICOS

3.1 Epidemiologia

Segundo Cavaliere (1996), as ocorrências de intoxicação por pesticidas organofosforados têm diminuído desde os anos 80, porém continuam altas. De acordo com dados estatísticos dos Centros de Toxicologia de Belo Horizonte, Campinas, Florianópolis, Ribeirão Preto, Londrina e Maringá, cerca de 35% dos 495 casos de intoxicações ocupacionais se deveram ao uso de organofosforados e aproximadamente 48% dos 622 casos de tentativa de homicídio resultaram do consumo de compostos deste grupo.

Somente no ano de 2004, foram notificados no Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS), 40 casos de intoxicação por agentes anticolinesterásicos em animais de companhia (DALLEGRAVE, 2006).

Na Tabela 1 são apresentados os dados referentes aos registros de exposição humana a pesticidas organofosforados e carbamatos, pelo Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul, referentes ao ano 2005. Estas substâncias incluem produtos de uso agrícola, veterinário e mesmo doméstico.

Tabela 1. Exposição humana a organofosforados e carbamatos, registradas no CIT/RS em 2005.

Produto	Número de casos
Agrotóxicos	1028
Carbamatos	108
Organofosforados	273
Inseticidas uso doméstico	974
Carbamatos/organofosforados	165
Produtos uso veterinário	271
Carbamatos	8
Organofosforados	22
Total de pesticidas	2273
Total de organofosforados/carbamatos	576

Pesticidas colinérgicos, principalmente organofosforados e carbamatos, são largamente utilizados no controle de moscas e carrapatos em cães e gatos. As intoxicações por estes

produtos ocorrem por exposições acidentais, uso intencional e reações de hipersensibilidade alérgica ou idiossincrática, embora os últimos sejam raros. (WINGFIELD, 1998)

3.2 Sinais clínicos

Os sinais clínicos, em mamíferos, caracterizam-se principalmente por lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes de broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas e bradicardia, bem como de depressão do sistema nervoso central, sendo as principais causas de morbidade e mortalidade por tais produtos (CAVALIERE, 1996).

3.3 Tratamento

O tratamento inclui administração de eméticos, adsorventes e atropina ou difenidramina (não deve ser usada concomitantemente à atropina). Em casos de intoxicação por organofosforados, pode-se usar reativadores de colinesterase, como pralidoxima, que não são indicados quando o agente for carbamato (SREBOČAN, 2003). A pralidoxima é uma das oximas mais utilizadas. São moléculas que possuem um nitrogênio quaternário que se liga ao sítio aniônico das colinesterases, deslocando a ligação dos organofosforados junto ao sítio esterásico, estabelecendo ligação oxima-organofosforado, reativando a enzima. Porém, a efetividade do tratamento depende da administração logo após a exposição, quando a ligação ainda não está totalmente estável. As oximas não são eficazes para antagonizar efeitos de carbamatos, uma vez que estes apresentam uma hidrólise mais rápida e a pralidoxima possui atividade anticolinesterárica fraca (SPINOSA, 2002).

Os resultados de um estudo realizado por Cavaliere (1996), induzindo intoxicação em ratos albinos com o organofosforado paraoxon, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Intensidade dos sinais de intoxicação pelo organofosforado Paraoxon em ratos Wistar.

Sinal	Controle	Paraoxon	Paraoxon + atropina	Paraoxon + pralidoxima
Ptialismo	-	+++	+	-
Lacrimejamento	-	+++	+	-
Exoftalmia	-	+++	++	-
Tremores	-	+++	++	-
Dispnéia	-	+++	+	-
Fasciculação muscular	-	+++	+++	-
Ataxia	-	+++	++	-
Prostração	-	+++	+	-
Diarréia	-	+++	-	-

Intensidade dos sinais: +: leve; ++: moderado; +++: intenso.

Fonte: Cavaliere (1996)

Os animais tratados com paraoxon e paraoxon mais atropina apresentaram resultados de atividade da colinesterase de 32,2% e 43,8%, respectivamente, revelando diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,01$) em relação ao grupo-controle. Já os animais tratados com paraoxon mais pralidoxima apresentaram atividade da colinesterase de 94,1%, não havendo diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo-controle (CAVALIERE, 1996).

A atropina, agindo como inibidor competitivo da acetilcolina nos receptores muscarínicos, e não nos nicotínicos, não impede o desenvolvimento de sinais musculares, como fasciculações, tremores e ataxia, além de miopatia, como necrose e desorganização da trama intermiofibrilar. Já a pralidoxima impede a inibição da colinesterase plasmática e previne o desenvolvimento de miopatia (CAVALIERI, 1996).

4 DIAGNÓSTICO DE INTOXICAÇÃO PELA MEDIDA DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE

O diagnóstico é feito por associação da história com sinais clínicos de estimulação músculo-esquelética e parassimpática. Análises químicas geralmente não são compensadoras devido ao rápido metabolismo, que resulta em baixos níveis teciduais. O inseticida pode ser encontrado no estômago ou seu metabólito na urina (WIENGFELD, 1998). O diagnóstico pode ser feito, segundo Rabelo (2005) baseado na resposta ao tratamento com atropina e suporte.

Um aspecto importante no diagnóstico é a avaliação do grau de inibição da acetilcolinesterase no sangue total, soro ou tecidos. Uma redução a menos de 25% da atividade desta enzima é indicativo de exposição excessiva (WIENGFELD, 1998). Segundo Furlanello (2006), uma redução da atividade enzimática maior ou igual a 50% em relação aos níveis de referência normais, associados com história compatível, sinais clínicos e resposta ao tratamento específico (atropina), é sugestiva de intoxicação.

A alteração na atividade da colinesterase pode permanecer por dias até várias semanas, dependendo do produto utilizado. Alguma diminuição da atividade é esperada com o uso de inseticidas de rotina. Portanto, a atividade da enzima deve ser usada apenas como indicativo do seu estado no organismo. (WIENGFELD, 1998).

Estudo realizado por Tecles (2000) confirmou a eficácia da determinação de colinesterase por espectrofotometria em sangue total. Embora maior inibição tenha sido observada utilizando-se butirilcolina como substrato, foi recomendado pelos autores que se analise também acetilcolina, uma vez que alguns organofosforados e carbamatos podem inibir seletivamente a acetil, mas não a pseudocolinesterase. Os kits comerciais de rotina utilizam apenas uma das enzimas como substrato, detectando apenas atividade parcial de colinesterase.

Em humanos, colinesterase sanguínea, acetilcolinesterase de eritrócitos e butirilcolinesterase sérica são biomarcadores enzimáticos para detectar risco em potencial por exposição a carbamatos e organofosforados. Os métodos empregados devem ser rápidos e eficientes para monitorar populações alvo e poder controlar episódios de exposição a pesticidas ou ataques terroristas por armas químicas. Trabalhadores que têm contato com produtos que contenham inibidores de colinesterase na sua formulação são testados e afastados do trabalho se os níveis da atividade desta enzima estiverem baixos, só podendo

retornar quando os exames resultarem em valores iguais ou maiores a 80% dos níveis basais (WILSON, 2005).

Além disso, a avaliação da atividade das colinesterases pode detectar exposição a outros contaminantes, como detergentes e alguns metais (TECLES, 2002). Ainda, em medicina humana, a determinação da colinesterase sérica é usada para avaliação de função hepática (TRUNDLE, 1988) e variantes atípicos causadores de apnéia prolongada em pacientes cirúrgicos que receberam drogas curarizantes (FURLANELLO, 2006).

Existem poucos estudos a respeito dos níveis de referência da atividade de colinesterase em cães. O único que trata de colinesterase sérica canina é o de Abdedkader e Hauge, de 1986, encontrando valores de referência entre 2000-5000 U/L, semelhantes ao trabalho de Furlanello (2006). Em outro estudo realizado por Thong (1995), medindo atividade de colinesterase plasmática, foram encontrados valores entre 860-3600 U/L, analisando-se 30 cães da raça Beagle, saudáveis, pelo método de Ellman. No entanto, é difícil a comparação entre valores de referência de diferentes estudos devido às diferenças individuais e de metodologias aplicadas (FURLANELLO, 2006).

Em estudo avaliando banhos de imersão com clorpirifós, observou-se que ocorreu inibição da butirilcolinesterase em 50-75% e acetilcolinesterase em 11-18% em um protocolo em que não se realizavam banhos nos animais tratados. Quando foram banhados entre os tratamentos, os cães não apresentaram inibição significativa da atividade enzimática. A maior taxa de inibição da colinesterase plasmática foi observada após 7 dias da primeira aplicação, mais intensa do que a observada 4 horas após, provavelmente devido a bioativação do clorpirifós para clorpirifós-oxon. A atividade da colinesterase plasmática não retornou aos valores controle após 3 semanas (BOONE, 2001).

Em estudo realizado por Furlanello (2006) em cães doentes, com sinais clínicos hepáticos, foi diagnosticado cirrose hepática ou fibrose em todos os animais com aumento de pseudocolinesterase; já nos cães com redução da atividade da enzima, foi diagnosticado infiltração neoplásica massiva em fígado. Ao contrário, em humanos, a principal causa de redução de pseudocolinesterase são doenças hepáticas, como fibrose e cirrose. Portanto, são necessários mais estudos a fim de gerar informações a respeito de sensibilidade e especificidade da atividade da pseudocolinesterase em cães com desordens clinicopatológicas (FURLANELLO, 2006).

4.1 Métodos analíticos

Existem vários métodos que podem ser usados para determinar colinesterase no sangue, porém seus resultados são difíceis de serem inter-relacionados. Um deles é o método de Micheal, que mede a quebra da acetilcolina com um pHmetro. Outro é o método de Johnson e Russel, que utiliza acetilcolinesterase radioativa, apresenta alta acurácia, porém custo muito elevado (WILSON, 2005).

A técnica espectrofotométrica mais utilizada para medir atividade de colinesterase em sangue total, eritrócitos ou plasma de caninos é chamada método de Ellman. É facilmente adaptado para uso em analisadores automáticos, com finalidade de processamento rápido de grande número de amostras. O método de Ellman é baseado na taxa de hidrólise de ésteres de tiocolina, como butiril, acetil ou propioniltiocolina pela colinesterase presente na amostra. O processamento original da técnica utiliza DTNB [5.5-dithiobis (2 nitrobenzoic acid)], sendo detectada alta capacidade catalítica de pseudocolinesterase, requerendo soro diluição prévia ou uso de volumes muito pequenos da amostra, reduzindo sua precisão. A técnica modificada utiliza outro indicador, o hexacianoferrato de potássio, aumentando a precisão da determinação da pseudocolinesterase humana no soro e plasma. O substrato hidrolisado pela colinesterase presente na amostra é a butiriltiocolina. A tiocolina reage com um cromóforo amarelo (hexacianoferrato III) para produzir hexacianoferrato II, incolor, que é medido em 405nm. O método de Ellman modificado foi testado por Furlanello et al. (2006) em amostras de caninos, obtendo resultados satisfatórios. Não foi encontrada diferença entre as técnicas de Ellman e Ellman modificada, usando diferentes cromógenos, como o DTNB e 2-PDS (FURLANELLO, 2006).

Segundo Tecles (2002), 2-PDS tem sido sugerido como um cromóforo alternativo ao uso do DTNB, na análise de sangue total, devido ao produto da reação entre 2-PDS e tiocolina, 2-tiopiridona, ser mensurada em 343nm, reduzindo interferência com hemoglobina e permitindo o uso de amostras menos diluídas.

Podem ser considerados dois tipos de variações na determinação da colinesterase. Uma, considerada pré-analítica, relacionada com variações individuais, coleta e armazenamento da amostra; e outra, analítica, relacionada com o método analítico em si. Algumas das variações analíticas que devem ser consideradas, porém que já foram estudadas são concentração do cromóforo, diluição do agente e substrato ideal para sangue total. No entanto, existem variáveis que ainda necessitam mais informações a respeito, como as condições de estocagem da amostra, anticoagulantes, temperatura da reação, estocagem do reagente, pH, concentração

do substrato, pois podem alterar os resultados, especialmente quando o 2-PDS é usado como cromóforo (TECLA, 2002).

Em cães, a utilização de plasma e eritrócitos é preferível para determinação de atividade de colinesterase uma vez que esta está distribuída 50-60% em eritrócitos (acetilcolinesterase) e 40-50% em plasma (pseudocolinesterase). A pseudocolinesterase é a enzima mais utilizada para avaliar doença hepática (FURLANELLO, 2006).

Estudo realizado por Kolf-Clauw (2000) mostra que, usando sangue total ao invés de eritrócitos separados do plasma, minimiza-se a variabilidade de atividade de colinesterase na porção rica em hemoglobina.

Segundo Tecles (2002), com exceção de aves, que não apresentam colinesterase em seus eritrócitos, sendo indicada a análise do plasma, o uso de sangue total é preferível devido a vários fatores, como não haver necessidade de separar eritrócitos do plasma, minimiza a pobre precisão e sensibilidade quando se usa amostras de eritrócitos, o volume da amostra necessário é reduzido, hemólise da amostra não irá causar efeitos negativos.

Quanto à estabilidade da amostra, usando-se acetiltiocolina como substrato, amostras diluídas se mostraram instáveis e tiveram redução na sua atividade após 24 horas quando mantidas a 25 e 4^oC. Amostras não diluídas se mantiveram estáveis por 2 semanas mantidas nas mesmas temperaturas. Amostras congeladas, diluídas ou não, se mantiveram estáveis por um mês, apresentando redução significativa na atividade entre 3 e 6 meses de estocagem. Usando butiriltiocolina, as amostras diluídas se mantiveram estáveis por 3 dias a 25 e 4^oC e um mês quando congeladas. Amostras não diluídas não apresentaram alterações entre 2 semanas e 3 meses a temperatura de 25 e 20^oC, porém houve aumento da atividade após 3 dias quando estocada a 4^oC (TECLES, 2002).

Quanto ao efeito do anticoagulante, não houve diferenças significativas usando heparina, EDTA, citrato de sódio e fluoreto de sódio. No entanto, estudo anterior realizado por Ward e Hess (1971), EDTA e heparina foram referidos como anticoagulantes mais indicados para esta análise (TECLES, 2002).

Em relação à temperatura, diferenças significativas são observadas quando se processa o material em diferentes temperaturas. A 40^oC, obteve-se o maior nível de atividade de colinesterase. Temperaturas mais baixas resultaram em decréscimo na atividade (TECLES, 2002).

Não foram obtidas diferenças significativas quando se usou reagente preparado no momento do processamento ou quando armazenado em diferentes temperaturas, após 3

meses. Os maiores valores obtidos para colinesterase foram encontrados em pH entre 8 e 8,5 (TECLES, 2002).

Ainda segundo estudo realizado por Tecles (2002), a concentração ideal para análise de acetil e butirilcolinesterase de sangue total é de $1 \times 10^{-3} \text{M}$, embora os kit comerciais indiquem uma concentração de $>5 \times 10^{-3} \text{M}$.

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 Animais

Foram utilizados 10 cães, do sexo masculino, sem raça definida, adultos (entre 2 e 5 anos de idade), entre 5 e 15 kg, residentes na cidade de Caxias do Sul, que não tivessem feito uso prévio de coleira impregnada com agentes anticolinesterásicos. Os responsáveis pelos cães foram informados sobre os objetivos da pesquisa e consentiram que seus animais participassem. Estes responderam a um questionário epidemiológico (Apêndice A), onde prestaram informações a respeito do estado de saúde geral dos animais, se comprometeram a permitir as colheitas sanguíneas e a seguir orientações de manejo dos mesmos durante o período do experimento. Foram selecionados animais que apresentaram hemograma e análises bioquímicas dentro dos valores de referência para a espécie.

5.2 Análises

Os cães selecionados para o experimento foram levados até a Clínica Veterinária Fauna, situada em Caxias do Sul, para que fossem feitas as colheitas sanguíneas. Estes haviam sido submetidos a jejum prévio de 8 horas.

As amostras de sangue foram coletadas utilizando-se seringa de 10ml, em tubos com EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) a 10% e sem anticoagulante, das veias cefálica ou jugular, dependendo do porte do animal. Os frascos com anticoagulante foram refrigerados e os frascos sem anticoagulante, após repouso de 1 hora, foram centrifugados por 15 minutos, a 2500rpm, em centrífuga Centribio modelo 80-2B. Em seguida, o soro foi separado em alíquotas duplas, em *ependorfs* e congelado.

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS, em Porto Alegre, no dia seguinte, para processamento das análises. Foram realizados hemograma e proteína plasmática total por refratometria. Utilizando-se uma das alíquotas do soro, foram realizados alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) (quando houve alteração na enzima anterior) e creatinina, em espectrofotômetro da marca Lab Quest e kits da marca Labtest.

Os valores de referência levados em consideração no presente experimento e as variações obtidas a partir das amostras acima encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Valores hematológicos e bioquímicos no dia 0.

Parâmetros	Intervalos de referência	Variações encontradas
Hematócrito (%)	37-55	46-56
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	5,5-8,5	5,9-7,9
Hemoglobina (g/dl)	12-18	15,6-19,9
VCM (fl)	60-77	64,4-77,9
CHCM (%)	32-36	33,13-39
PPT (g/l)	60-80	68-78
Leucócitos totais (μl)	6000-17000	7400-12900
Neutrófilos Segmentados(μl)	3000-11500	3848-8643
Eosinófilos (μl)	100-1250	470-3538
Basófilos(μl)	raros	0-148
Linfócitos (μl)	1000-4800	1230-3572
Monócitos (μl)	150-1350	122-984
ALT (U/L)	<102	31,4-131
Creatinina (mg/dl)	0,5-1,8	0,83-1,18
FA (U/L)	<156	41

Os resultados individuais na íntegra encontram-se no Apêndice B.

Estando os resultados próximos aos limites da normalidade considerados, foi realizada análise da butirilcolinesterase sérica, utilizando kit comercial do Laboratório Wiener, em Espectrofotômetro UV/visível, modelo Cary 1E, marca Varian, com comprimento de onda de 405nm.

Os cães receberam, no dia da coleta, classificado com o dia 0, uma coleira antiparasitária contra pulgas e carrapatos de venda regulamentar, contendo o diazinon como princípio ativo. Estas foram mantidas no local por 4 meses, prazo limite de validade na ação contra pulgas, segundo o fabricante. Os animais não foram banhados até a colheita seguinte, que ocorreu 7 dias após a colocação da coleira.

Nos dias 7, 60 e 120, foi realizada nova colheita de sangue, em frasco sem anticoagulante. O soro foi congelado para nova avaliação da atividade da butirilcolinesterase, creatinina e ALT.

Nas colheitas dos dias 60 e 120, foram utilizados apenas 8 cães, devido a um dos proprietários ter desistido do experimento e o outro cão ter sofrido acidente automobilístico.

No momento da colheita do dia 120, foram retiradas as coleiras.

Os valores obtidos podem ser visualizados nas Figuras 1 e 2.

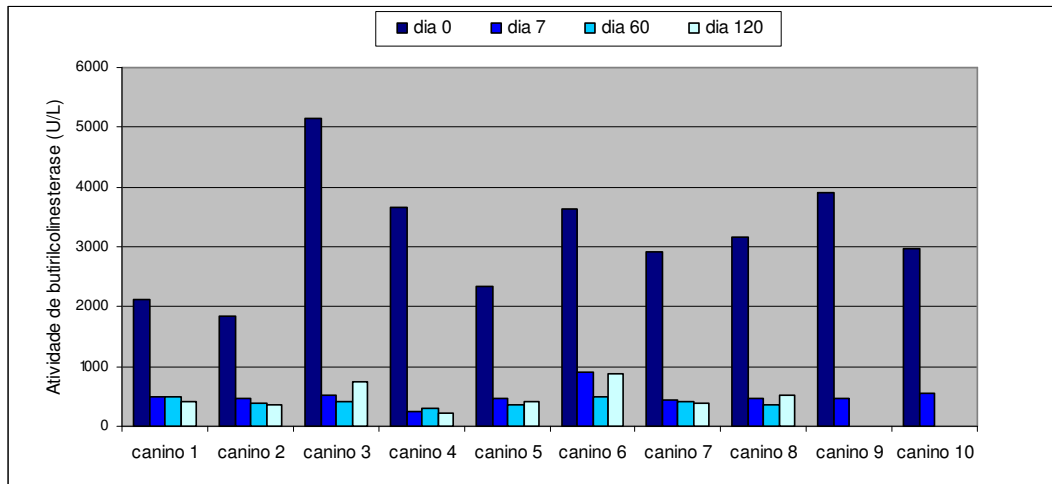


Figura 1. Atividade da butirilcolinesterase sérica individual de cães machos adultos, antes e após 7, 60 e 120 dias do uso de coleira impregnada com diazinon.

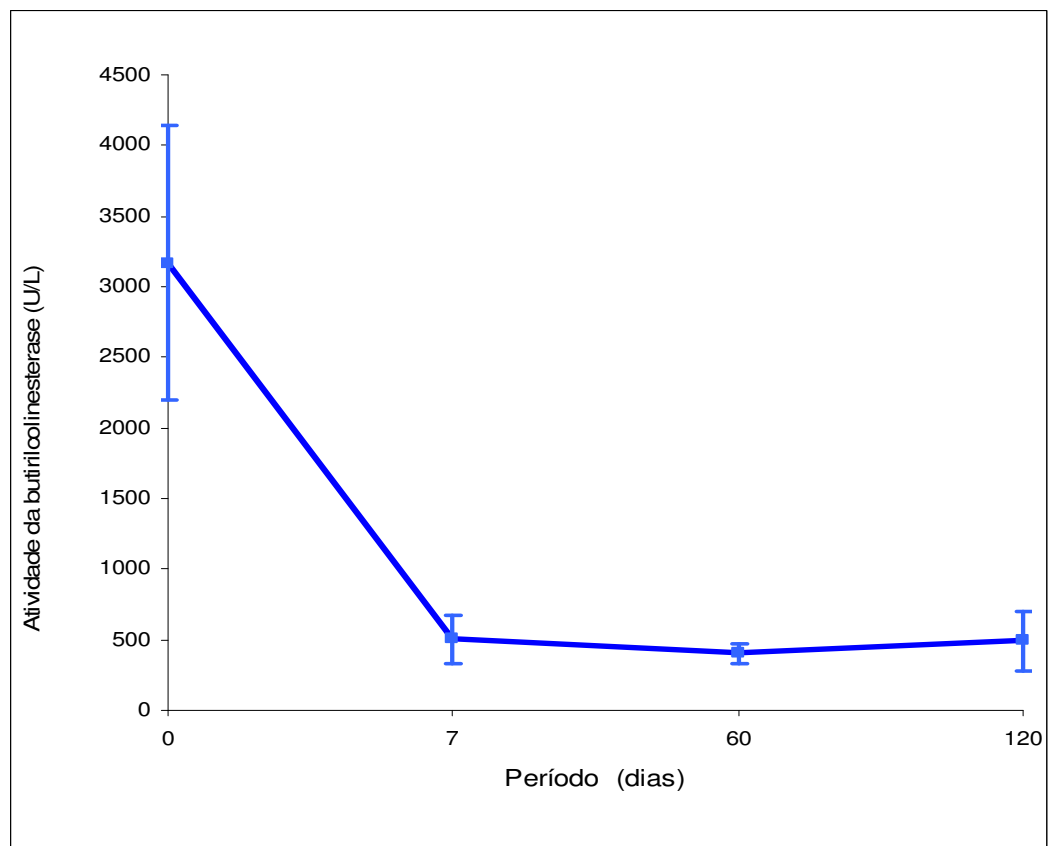


Figura 2. Atividade da butirilcolinesterase sérica média de cães machos adultos, antes e após 7, 60 e 120 dias do uso de coleira impregnada com diazinon.

Os valores de bioquímica permaneceram próximos aos intervalos de referência, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Valores bioquímicos encontrados nos dias 7, 60 e 120.

Parâmetros	Intervalos de referência	Variações encontradas
ALT (U/l)	<102	26-199
Creatinina (mg/dl)	0,5-1,8	0,5-1,05

Os resultados completos encontram-se no Apêndice C.

6 DISCUSSÃO

Pode-se observar, pelos dados obtidos no experimento, que os níveis basais para a enzima butirilcolinesterase variam significativamente entre os animais, ainda que estes tenham sido selecionados obedecendo alguns parâmetros, como sexo, faixa etária, estado de saúde, massa corporal, etc. Segundo Moraes (1999), as variações individuais em humanos ficam em torno de 15%. No presente trabalho, as variações encontradas entre os níveis basais dos cães foram de aproximadamente 30%. Segundo Furlanello (2006), existem poucos estudos a respeito dos níveis de referência da atividade de colinesterase em cães. Abdedkader e Hauge, em 1986, realizaram um experimento medindo colinesterase sérica canina, encontrando valores de referência entre 2000-5000 U/L. Em estudo realizado por Thong (1995), medindo atividade de colinesterase plasmática, foram encontrados valores entre 860-3600 U/L, pelo método de Ellman. No presente trabalho, a butirilcolinesterase sérica basal encontrou-se entre 2112 e 5144 U/L, semelhante ao encontrado por Furlanello (2006), que também utilizou o método de Ellman modificado. No entanto, é difícil a comparação entre valores de referência de diferentes estudos devido às diferenças individuais e de metodologias aplicadas (FURLANELLO, 2006).

Após 7 dias da colocação das coleiras, houve queda drástica dos valores séricos da enzima, encontrando-se entre 6 e 25% da sua atividade, ficando a média em 17%. Em humanos, segundo Wiengfield (1998), uma redução para 25% da atividade da colinesterase já pode ser considerada exposição excessiva. O pico de queda da atividade da butirilcolinesterase ocorreu após 60 dias de uso da coleira, ficando os valores compreendidos em 8 e 22%, com média de 14%. Em estudo realizado por Boone (2001) com banhos de imersão utilizando clorpirifós, as quedas de atividade da butirilcolinesterase encontraram-se entre 50 e 75%, com pico após 7 dias da primeira aplicação do produto, diferindo do presente trabalho.

Na colheita realizada no dia 120, observou-se um aumento leve na atividade enzimática, com valores aproximando-se dos ocorridos no dia 7, estando entre 6 e 24%, com média de 16%. A atividade da colinesterase plasmática não retornou aos valores controle após 3 semanas no estudo anteriormente citado, realizado por Boone (2001).

Embora se tenha observado alterações significativas na atividade enzimática dos cães submetidos ao experimento, nenhum deles manifestou qualquer sinal clínico compatível com intoxicação, como sialorréia, lacrimejamento, secreção nasal, dispnéia, respiração ruidosa,

miose, vômito, diarreia, fasciculações musculares, tremores, convulsões ou espasmos. Percebe-se a necessidade de mais pesquisas nesta área, a fim de correlacionar a redução da atividade da colinesterase com a manifestação de sinais clínicos. Porém, observa-se que, com atividade da colinesterase bastante reduzida, para até 6%, como foi observado no paciente 4, os cães ainda se mantiveram em estado normal de saúde. Pode se concluir que a utilização de coleiras impregnadas com agentes anticolinesterásicos constitui um método seguro para controle de ectoparasitas. Ainda, estas coleiras apresentam um custo razoavelmente baixo, principalmente quando se leva em conta o seu período de ação de aproximadamente 4 meses. Portanto, este pode se tornar um método efetivo e financeiramente viável para populações de mais baixa renda, assim como para abrigos de animais abandonados e até canis municipais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do presente trabalho, pode-se concluir que as intoxicações por agentes anticolinesterásicos representam um problema freqüente, tanto na área humana quanto veterinária, culminando com a morte em muitos casos. Nos atendimentos a pequenos animais, o diagnóstico é feito apenas baseando-se nos sinais clínicos e resposta ao tratamento. A medida da atividade da enzima colinesterase pode ser muito útil no diagnóstico definitivo destas intoxicações, embora seja necessário conhecer os fatores que podem interferir na sua atividade, como idade, raça, sexo, estado de saúde, medicamentos; além dos fatores que dizem respeito aos métodos analíticos, para uma correta interpretação dos resultados.

Em relação à utilização de coleiras comerciais impregnadas com agentes anticolinesterásicos, neste caso específico, um organofosforado, o diazinon, concluiu-se que ocorre interferência significativa, com redução na atividade da butirilcolinesterase de cães machos adultos, chegando a uma média de 17% da sua atividade após 7 dias de uso, com pico de 14% após 60 dias. Embora estas alterações tenham sido acentuadas, nenhum dos animais do presente estudo manifestou sinais clínicos de intoxicação nem tampouco alterações em outras enzimas, como ALT e creatinina.

Estudos ainda são necessários para se conhecer mais sobre esta enzima, como sua correlação com problemas hepáticos e a faixa de atividade responsável por indução de sinais clínicos, por exemplo.

REFERÊNCIAS

- ABDELKADER, S. V., HAUGE, J. G. Serum determination in the study of liver disease in dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 27, 1986. p. 50-79.
- ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002. 697 p.
- AHRENS, F. A. **Farmacologia veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 360 p.
- BAREGGI, S. R.; GIACOBINI, E. Acetylcholinesterase activity in ventricular and cisternal CSF in dogs: effects of chlorpromazine. **J. Neurosc. Res. Milão**, v.3, 1978. p. 335-339. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 27 nov 2006.
- BEASLEY, V. **Toxicants that affect the autonomic nervous system. International Veterinary Information Service**. Illinois. 1999. Disponível em :<<http://www.ivis.org>>. Acesso em: dez de 2006.
- BOONE, J. S. et al. Transferable residues from dog fur and plasma cholinesterase inhibition in dogs treated with a flea control dip containing chlorpirifos. **Environ. Health Perspect. Mississippi**, v. 109, 2001. p. 1109-1114. Disponível em: <<http://www.ehpn1.niehs.nih.gov/docs/2001/109p1109-1114boone/abstract.html>>. Acesso em: 11 dez 2006.
- CAVALIERE, M. J.; et al. Miotoxicidade por organofosforados. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v. 30, 1996. Disponível em: <http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101996000300010>. Acesso em: 16 nov 2006.
- DALLEGRAVE, E.; SEBEN, V. C. **Toxicologia clínica: aspectos teórico práticos**. Polígrafo da disciplina de Toxicologia Clínica do curso de Especialização em Análises Clínicas Veterinárias, do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006. 89p.
- FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. 389 p.
- FURLANELLO, T.; et al. Validation of an automated spectrophotometric assay for the determination of cholinesterase activity in canine serum. **Vet. Res. Communications**. Pádua, v. 30, 2006. p. 723-733. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index>>. Acesso em: 19 dez 2006.
- GOLDSTON, R. T., HOSKINS, J. D. **Geriatrics e gerontologia cão e gato**. São Paulo: Roca, 1999. 551 p.
- KOLF-CLANW, M. et al. Acetyl and pseudo-cholinesterase activities of plasma, erythrocytes and whole blood in male beagle dogs using Ellman's assay. **Vet. Hum. Toxicology**, v. 42, 2000. p. 216-219. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> . Acesso em 27 nov 2006.

KORE, A. M., BEASLEY, V. **Overview of toxicants that affect neurotransmitters.** International Veterinary Information Service. Illinois. 1999. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: dez de 2006.

MORAES, A. C. L. **Intoxicações por Organofosforados e Carbamatos.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1999. Disponível em: <<http://www.portalteses.cict.fiocruz.br>>. Acesso em: 16 nov 2006.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998. 1084 p.

RABELO, R. C.; CROWE, D. T. **Fundamentos de terapia intensiva veterinária em pequenos animais.** Rio de Janeiro: L. F. livros de veterinária, 2005. 772 p.

RIO GRANDE DO SUL. SECRETARIA DA SAÚDE. FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PRODUÇÃO E PESQUISA EM SAÚDE. CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA DO RIO GRANDE DO SUL. **Toxicovigilância-toxicologia clínica: dados e indicadores selecionados.** Rio Grande do Sul, 2005/ Organizado por Alberto Nicoletta. Porto Alegre: CIT/RS, 2006. 99 p.

SÃO PAULO. SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **Manual de produtos veterinários: MPV-2001/2002.** São Paulo, 2001/Coordenado por Ricardo Rego Pamplona. São Paulo: Ed. Robe, 2001. 970 p.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 918 p.

SREBOCAN, E. Poisoning with acetylcholinesterase inhibitors in dogs: two case reports. **Vet. Med. Czech.**, v. 48, 2003. p. 175-176. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 27 nov 2006.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Fisiologia dos Animais Domésticos.** 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.

TECLES, F.; et al. Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. **The Veterinary Journal.** Murcia, v.160, 2000. p. 242-249. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em: 19 dez 2006

TECLES, F.; et al. Effects of different variables on whole blood cholinesterase analysis in dog. **J. Vet. Diagn. Invest.** Murcia, v. 14, 2002. p. 132-139. Disponível em:<<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em: 19 dez 2006.

TRUNDLE, D.; MARCIAL, G. Detection of cholinesterase inhibition: the significance of cholinesterase measurements. **Clinical and Laboratory Science.** Whiting, v. 18, 1988. p. 345-352. Disponível em: <<http://www.annclinlabsci.org>>. Acesso em: 27 nov 2006.

WILSON, B. W.; ARRIETA, D. E.; HENDERSON, J. D. Monitoring cholinesterase to detect pesticide exposure. **Chemico-Biological Interactions,** Califórnia, v. 157, 2005. p. 253-256. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 19 dez 2006.

WINGFIELD, W. E. **Segredos em medicina veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 1998. 546 p.

WINTER, V. P. **Índice Terapêutico Veterinário: ITV**, 2003/2004. Rio de Janeiro: EPUD, 2002. 637 p.

APÊNDICE A - Questionário epidemiológico

Paciente:

Massa corporal:

1. Qual o ano de nascimento do seu cão?
2. Ele passa a maior parte do dia dentro ou fora de casa?
3. Ele faz passeios fora da área da sua casa? Sai sem supervisão?
4. Tem algum problema de saúde?
5. Se alimenta bem? Qual a sua dieta?
6. Quando foi a última vez que recebeu vermífugos e vacinas? Quais produtos e doses foram utilizados?
7. Você usa algum produto contra pulgas e carrapatos no seu cão? Qual?
8. Qual foi a última vez que fez uso deste produto?
9. Seu cão já usou coleira anti-pulgas?
10. Com que frequência você banha seu cão?
11. O experimento em questão consiste em testar a atividade da enzima colinesterase após 7 de uso de coleira antipulgas, para avaliar sua segurança, através de análise sanguíneas. Você concorda que quatro coletas de sangue com intervalos de uma semana a 2 meses sejam feitas em seu cão?
12. Você se compromete em não banhá-lo durante o período da experimentação?

APÊNDICE B - Valores hematológicos e bioquímicos no dia 0.

Paciente 1:

Eritrograma

Hematócrito (%): 46
Eritrócitos (milhões/mm³): 5,9
Hemoglobina (g/dl): 15,6
VCM: 77,96
CHCM: 33,91
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:

Bioquímica

PPT: 7,0 g/dl
ALT: 31,4 u/l
Creatinina: 0,93 mg/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 12200
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 65% (7930)
Eosinófilos: 15% (1830)
Basófilos:
Linfócitos: 19% (2318)
Monócitos: 1% (122)
Plasmócitos
Plaquetas

Paciente 2

Eritrograma

Hematócrito (%): 56
Eritrócitos (milhões/mm³): 7,5
Hemoglobina (g/dl): 18,8
VCM: 74,66
CHCM: 33,57
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:

Bioquímica

PPT: 7,0 g/dl
ALT: 57,6 U/L
Creatinina: 1,07 mg/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 9900
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 62% (6138)
Eosinófilos: 0
Basófilos
Linfócitos: 21% (2079)
Monócitos: 2% (198)
Plasmócitos
Plaquetas: 320000

Paciente 3

Eritrograma

Hematócrito (%): 56
Eritrócitos (milhões/mm³): 7,55
Hemoglobina (g/dl): 19,4
VCM: 74,17
CHCM: 34,64
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:

Bioquímica

PPT: 7,4 g/dl
ALT: 73,3 U/L
Creatinina: 1,18 mg/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 7500
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 53% (3975)
Eosinófilos: 20% (1500)
Basófilos
Linfócitos: 25% (1875)
Monócitos: 2% (150)
Plasmócitos
Plaquetas: 280000

Paciente 4

Eritrograma

Hematócrito (%): 52
Eritrócitos (milhões/mm³): 7,18
Hemoglobina (g/dl): 17,8
VCM: 72,4
CHCM: 34,2
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:

Bioquímica

PPT: 7,0 g/dl
ALT: 36,6 U/L
Creatinina: 0,83 mg/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 9500
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 70% (6650)
Eosinófilos: 9% (855)
Basófilos
Linfócitos: 18% (1710)
Monócitos: 3% (285)
Plasmócitos
Plaquetas: 488000

Paciente 5

Eritrograma

Hematócrito (%): 55
Eritrócitos (milhões/mm³): 7,81
Hemoglobina (g/dl): 18,9
VCM: 70
CHCM: 34,36
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:

Bioquímica

PPT: 6,8 g/dl
ALT: 62,8 U/L
Creatinina: 1,1 mg/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 8200
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 65% (5330)
Eosinófilos: 8% (656)
Basófilos
Linfócitos: 15% (1230)
Monócitos: 12% (984)
Plasmócitos
Plaquetas: 398000

Paciente 6

Eritrograma

Hematócrito (%): 49%
Eritrócitos (milhões/mm³): 6,31
Hemoglobina (g/dl): 17
VCM: 77,6
CHCM: 34,7
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:

Bioquímica

PPT: 7,8 g/dl
ALT: 31,4 U/L
Creatinina: 1,02 mg/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 12900
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 67% (8643)
Eosinófilos: 6% (774)
Basófilos
Linfócitos: 24% (3096)
Monócitos: 3% (387)
Plasmócitos
Plaquetas:

Paciente 7

Eritrograma

Hematócrito (%): 46
Eritrócitos (milhões/mm³): 6,16
Hemoglobina (g/dl): 16,3
VCM: 74,7
CHCM: 35,4
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:
1 metarrubricito

Bioquímica

PPT: 7,4 g/dl
ALT: 57,5 U/L
Creatinina: 1,09 mg/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 8900
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 55% (4895)
Eosinófilos: 13% (1157)
Basófilos
Linfócitos: 28% (2492)
Monócitos: 4% (356)
Plasmócitos
Plaquetas:

Paciente 8

Eritrograma

Hematócrito (%): 51
Eritrócitos (milhões/mm³): 7,03
Hemoglobina (g/dl): 16,9
VCM: 72,54
CHCM: 33,13
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:

Bioquímica

PPT: 7,8 g/dl
ALT: 131 U/L
Creatinina: 1,0 mg/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 7400
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 52% (3848)
Eosinófilos: 13% (962)
Basófilos: 2% (148)
Linfócitos: 28% (2072)
Monócitos: 5% (370)
Plasmócitos
Plaquetas:

Paciente 9

Eritrograma

Hematócrito (%): 51
Eritrócitos (milhões/mm³): 7,92
Hemoglobina (g/dl): 19,9
VCM: 64,4
CHCM: 39
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:

Bioquímica

PPT: 7,2 g/dl
ALT: 57,6 U/L
Creatinina: 1,03 g/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 9400
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 55% (5170)
Eosinófilos: 5% (470)
Basófilos
Linfócitos: 38% (3572)
Monócitos: 2% (188)
Plasmócitos
Plaquetas:

Paciente 10

Eritrograma

Hematócrito (%): 49
Eritrócitos (milhões/mm³): 7,42
Hemoglobina (g/dl): 17,4
VCM: 66
CHCM: 35,5
Eritroblastos (%)
Reticulócitos (%)
Observações:

Bioquímica

PPT: 6,8 g/dl
ALT: 41,9 U/L
Creatinina: 1,05 mg/dl

Leucograma

Leucócitos totais (mil/mm³): 12200
Mieloblastos
Mielócitos
Metamielócitos
Bastonetes
Segmentados: 48% (5856)
Eosinófilos: 29% (3538)
Basófilos
Linfócitos: 20% (2440)
Monócitos: 3% (366)
Plasmócitos
Plaquetas:

APÊNDICE C - Valores de colinesterase e bioquímica nos dias 0, 7, 60 e 120.

Paciente 1

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)
12/abr	2112,03	31,4	0,93
19/abr	502,648	31,4	1,12
15/jun	482,5875	41	1,19
13/ago	410,294	36	0,83

Paciente 2

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)
12/abr	1854,65	57,6	1,07
19/abr	464,4195	41,9	1,04
15/jun	398,939	52	0,99
13/ago	356,1685	42	0,88

Paciente 3

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)
12/abr	5144,572	73,3	1,18
19/abr	526,4935	41,9	0,5
15/jun	421,2705	57	1,42
13/ago	730,505	84	1,09

Paciente 4

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)
12/abr	3664,259	36,6	0,83
19/abr	243,754	36,6	0,74
15/jun	292,5805	26	0,71
13/ago	221,801	47	0,6

Paciente 5

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)
12/abr	2336,859	62,8	1,1
19/abr	457,6065	57,6	1,21
15/jun	358,4395	42	0,96
13/ago	425,434	37	1,01

Paciente 6

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)
12/abr	3619,736	31,4	1,02
19/abr	920,1335	41,9	0,94
15/jun	488,265	27	0,99
13/ago	876,9845	47	1,02

Paciente 7

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)
12/abr	2915,207	57,5	1,09
19/abr	443,9805	57,6	1,17
15/jun	408,4015	36	1,11
13/ago	372,0655	57	1,03

Paciente 8

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)	FA (U/L)
12/abr	3168,424	131	1	41
19/abr	455,714	131	0,9	
15/jun	356,1685	110	1,05	
13/ago	528,0075	199	0,9	

Paciente 9

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)
12/abr	3905,363	57,5	1,03
19/abr	466,312	57,6	0,93
15/jun			
13/ago			

Paciente 10

Data	colinesterase	ALT (U/L)	creatinina (mg/dl)
12/abr	2967,819	41,9	1,05
19/abr	561,8454	73,3	1,06
15/jun			
13/ago			