



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA CLÍNICA E EFICÁCIA DO
COUMAFÓS NO TRATAMENTO DE *Ctenocephalides felis felis*
(BOUCHÉ, 1835) E *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) EM
CÃES INFESTADOS ARTIFICIALMENTE**

FABRÍCIO NASCIMENTO GAUDÊNCIO

Sob a orientação do Professor
Fábio Barbour Scott

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

636.70896936

G266a

T

Gaudêncio, Fabrício Nascimento, 1987-
Avaliação da segurança clínica e
eficácia do Coumafós no tratamento de
Ctenocephalides felis felis (BOUCHÉ, 1835)
e *Rhipicephalus Sanguineus* (LATREILLE,
1806) em cães infestados artificialmente /
Fabrício Nascimento Gaudêncio - 2012.
79 f.

Orientador: Fábio Barbour Scott.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Bibliografia: f. 57-63.

1. Cão - Parasito - Teses. 2.
Inseticidas - Efeito fisiológico - Teses.
3. Inseticidas - Toxicologia - Teses. I.
Scott, Fábio Barbour, 1966-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

Bibliotecário: _____

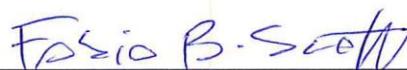
Data: ___/___/_____

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

FABRÍCIO NASCIMENTO GAUDÊNCIO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2012

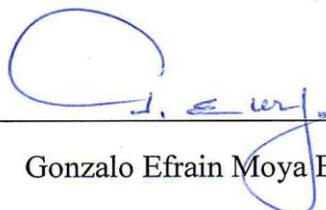


Fábio Barbour Scott, Ph.D, UFRRJ

(Orientador)



Julio Israel Fernandes, Dr., UFPA



Gonzalo Efrain Moya Borja, Ph.D, UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos os que me apoiaram, torceram e colaboraram para que mais esta etapa de minha vida se concretizasse.

Agradeço primeiramente a DEUS e atribuo plenamente a Ele esta vitória, por sempre me guiar e iluminar meus caminhos e meus estudos.

De forma especial, agradeço aos amigos do laboratório LQEPV pela ajuda na execução deste trabalho, especialmente a MARIA CLARA BOTELHO, PEDRO IVAN, RENATA ASSAD e DIEGO DIAS, minha equipe no Setor de Análises Clínicas, e aos demais pós-graduandos e bolsistas do laboratório: MONIQUE LAMBERT, LILIAN CRISTINA, CRISTIANE, MILENA BATISTA, BRUNO MACHADO e ALINE PEREIRA, pela ajuda, amizade e apoio durante a execução deste trabalho.

Agradeço também aos estagiários bolsistas e aos demais colegas do laboratório JULIANA PUIG, ANA LUIZA, JULIANA, CÁSSIO FLORÊNCIO, THAÍS RIBEIRO, VINÍCIUS e ALEXSANDRO pela amizade, ajuda e companheirismo durante esta caminhada.

Aos meus amigos da Farmacométrie: YARA CID, VIVIANE MAGALHÃES, DÉBORA, THAÍS, RODRIGO e NATÁLIA, agradeço pelo apoio, pelos momentos de descontração, pela amizade, aprendizado e torcida, que, sem dúvida, também contribuíram muito nesta trajetória.

Não poderia deixar de agradecer também à pessoa mais importante neste contexto, o meu orientador FABIO BARBOUR SCOTT, pelos conselhos, incentivos broncas e todo o crédito e confiança concedidos durante essa trajetória juntos. Muito aprendi durante minha passagem por este laboratório, de conselhos a aprendizados técnico-laboratoriais e tudo o que adquiri ali, com certeza, me auxiliarão na minha edificação como um profissional mais competente, responsável e perspicaz. Muito obrigado, LQEPV!

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, agradeço pelos conhecimentos passados nas excelentes aulas e pela ajuda durante a elaboração do projeto e conclusão da dissertação, principalmente aos professores JOÃO TELHADO pela excelente aula de Seminários e à professora RITA DE CÁSSIA BOTTEON pelas aulas de Metodologia da Pesquisa.

Agradeço também ao próprio curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pois todos, do coordenador às secretárias, sempre se mostraram solícitos, atenciosos e dispostos a ajudar seus alunos.

E por último, mas não menos importantes, agradeço de coração aos meus queridos pais JORGE e MARIA GAUDÊNCIO, às minhas irmãs RITA, PATRÍCIA e LUCIANA e à minha avó MARIA por toda a torcida, apoio, orações e preces que, com certeza, em muito contribuíram para que me dessem força para chegar ao fim de mais esta etapa na minha vida.

BIOGRAFIA

Fabrcio Nascimento Gaudcncio, filho de Jorge Moreira Gaudcncio e Maria das Graças Nascimento Gaudcncio, nasceu dia 9 de abril de 1987, na cidade de Belford Roxo, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o Ensino Fundamental no Centro de Educaço Boas Esperanças e, posteriormente, o Ensino Mdio no Colgio EME, ambos no municpio de Nova Iguaçu.

No ano de 2004, ingressou no Curso de Medicina Veterinria na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropdica, graduando-se em setembro de 2009.

Durante a Graduao, sempre se interessou pela rea de Anlises Clnicas e, por isso, estagiou desde meados do curso at graduar-se, em laboratrios particulares de Anlises Clnicas Veterinria: laboratrio CELV, em Nova Iguaçu e Clnica Veterinria Queimados, em Queimados, RJ.

As vsperas de concluir o curso de Medicina Veterinria, deu incio a Especializao *latu sensu* em Anlises Clnicas Veterinria pelo curso Qualittas de Ps-Graduao, recebendo a certificao de concluso em 2011.

Ao graduar-se, trabalhou no Laboratrio de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinria (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ como patologista responsvel pelo setor de Anlises Clnicas. L, exerceu atividades voltadas a testes de segurana clnica de produtos antiparasitrios, alm de realizar exames laboratoriais dos animais atendidos no Hospital Veterinrio da Universidade.

Em 2010, foi aprovado no Curso de Ps-Graduao, nvel de mestrado em Medicina Veterinria da UFRRJ, sob orientao do professor Fabio Barbour Scott.

E em 2011, foi aprovado na seleo ao Doutorado pela mesma Universidade no Curso de Ps-Graduao em Cincias Veterinrias, sob a orientao do professor Jairo Pinheiro, dando incio a uma nova etapa importante na vida acadmica.

RESUMO

GAUDÊNCIO, Fabrício Nascimento. **Avaliação da Segurança Clínica e Eficácia do Coumafós no Tratamento de *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ, 1835) e *Rhipicephalus Sanguineus* (LATREILLE, 1806) em Cães Infestados Artificialmente** 2012. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Os objetivos do estudo foram avaliar a eficácia pulguicida para *Ctenocephalides felis felis* e carrapaticida para *Rhipicephalus sanguineus*, bem como verificar a segurança clínica do organofosforado coumafós sob formulação comercial na forma de apresentação de sabonete parasiticida para cães. Foram utilizados 16 cães da raça Beagle, mantidos no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os espécimes de *C. f. felis* e *R. sanguineus* utilizados nas infestações artificiais foram provenientes das colônias mantidas no LQEPV. As eficácias pulguicidas nos dias +2 e +7, foram respectivamente 100% e 63,11%, enquanto que as eficácias carrapaticidas, foram respectivamente 99,62% e 43,25%. O coumafós apresentou boa eficácia pulguicida e carrapaticida com 48 horas de uso, porém, não houve boa eficácia residual após nova infestação. Em relação à segurança clínica, foram realizados exames hematológicos (hemograma completo) e bioquímicos (ALT, AST, fosfatase alcalina, GGT, uréia, creatinina e colinesterase sérica) para avaliação de possíveis efeitos tóxicos. Os animais não apresentaram alterações em exame clínico e laboratoriais que pudessem ser associados a efeitos adversos provenientes do uso do produto testado, demonstrando assim que o coumafós na formulação de sabonete parasiticida é seguro para uso em cães.

Palavras-chave: organofosforado, parasiticida, colinesterase.

ABSTRACT

GAUDÊNCIO, Fabrício Nascimento. **Evaluation of Safety Clinical and Effectiveness of Coumaphos in Treatment to *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ, 1835) and *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) on Dogs Infested Artificially** 2012. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The objectives of this study were to evaluate the effectiveness against the flea *Ctenocephalides felis felis* and the tick *Rhipicephalus sanguineus*, and also verify the clinical safety of organophosphate coumaphos in the commercial formulation in the form of presentation of parasiticide soap for dogs. Were used 16 Beagles dogs, kept in the Laboratory of Experimental Chemotherapy in Veterinary Parasitology (LQEPV), Department of Animal Parasitology, Veterinary Institute, University Federal Rural of Rio de Janeiro. Specimens of *C. f. felis* and *R. sanguineus* used in artificial infestations were derived from colonies maintained in LQEPV. Pulicide efficiencies in day +2 to +7, were respectively 100% and 63.11%, while the efficiencies acaricides were respectively 99.62% and 43.25%. The coumaphos presented good efficacy against fleas and ticks within 48 hours of use, however, there was no good residual efficacy after re-infestation. In relation to clinical safety, hematology tests were performed (complete hemogram) and biochemical (ALT, AST, alkaline phosphatase, GGT, urea, creatinine, and serum cholinesterase) for evaluation of possible toxic effects from the use of the product. The animals showed no changes in clinical examination and laboratory tests that could be associated with adverse effects from the use of tested products, thus demonstrating that the coumaphos parasiticide in the formulation of soap is safety for use in dogs.

Key words: organophosphate, parasiticide, cholinesterase.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classes e mecanismos de ação de pesticidas de uso comum no controle de ectoparasitas.....	6
Tabela 2. Quantidade de cães da raça Beagle, sexo, peso e quantidade de sabonete utilizado durante o estudo.....	16
Tabela 3. Cronograma de execução e o resumo das etapas da avaliação da segurança e eficácia do produto com as datas de infestação dos cães, coleta de sangue e exame clínico completo.	19
Tabela 4. Eficácia pulguicida para <i>Ctenocephalides felis felis</i> e carrapaticida para <i>Rhipicephalus sanguineus</i> do coumafós em formulação comercial para cães.	21
Tabela 5. Médias e desvios padrões das frequências respiratórias (movimentos/minuto) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.	22
Tabela 6. Médias e desvios padrões das frequências cardíacas (batimentos/minuto) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	23
Tabela 7. Médias e desvios padrões das temperaturas (°C) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	25
Tabela 8. Médias e desvios padrões das contagens de hemácias (cél/μL) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	26
Tabela 9. Médias e desvios padrões dos valores de hemoglobina (g/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.	27
Tabela 10. Médias e desvios padrões dos valores de hematócrito (%) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	28
Tabela 11. Médias e desvios padrões dos valores de volume corpuscular médio (VCM) (fL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	30
Tabela 12. Médias e desvios padrões dos valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	31
Tabela 13. Médias e desvios padrões dos valores de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	31

Tabela 14. Médias e desvios padrões das contagens de leucócitos totais (célis/ μ L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	34
Tabela 15. Médias e desvios padrões das contagens de segmentados (célis/ μ L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.	35
Tabela 16. Médias e desvios padrões das contagens de linfócitos (célis/ μ L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.	36
Tabela 17. Médias e desvios padrões das contagens de monócitos (célis/ μ L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.	37
Tabela 18. Médias e desvios padrões das contagens de eosinófilos (célis/ μ L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.	38
Tabela 19. Médias e desvios padrões das contagens de plaquetas (célis/ μ L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.	40
Tabela 20. Médias e desvios padrões das concentrações de proteína plasmática total (g/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	41
Tabela 21. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas de alanina aminotransferase (ALT) (U/L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	42
Tabela 22. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas de aspartato aminotransferase (AST) (U/L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	43
Tabela 23. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas de fosfatase alcalina (U/L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.	45
Tabela 24. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas de gama glutamil-transferase (GGT) (U/L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	46
Tabela 25. Médias e desvios padrões das concentrações séricas de uréia (mg/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.....	48
Tabela 26. Médias e desvios padrões das concentrações séricas de creatinina (mg/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.	49
Tabela 27. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas da colinesterase sérica (U/L) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	51

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Classes e subclasses de alguns organofosforados.	10
Quadro 2. Sinais clínicos mais comumente observados decorrentes da intoxicação por drogas anticolinesterásicas em cães.	12
Quadro 3. Valores de referência para parâmetros de exame clínico, exame hematológico e bioquímico para cães.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da molécula de acetilcolina	8
Figura 2. Estrutura básica de um organofosforado.....	9
Figura 3. Fórmula estrutural da molécula de coumafós.	13
Figura 4. Frequência respiratória (movimentos/ minuto) com limites de normalidade (limite máximo e mínimo), dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	23
Figura 5. Frequência cardíaca (batimentos/minuto) com valores de referência (limite máximo e mínimo), dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	24
Figura 6. Temperatura, (em °C) com valores de referência (limite máximo e mínimo), dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	25
Figura 7. Número de hemácias (10^6 cél/ μ L) com limites de normalidade (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	26
Figura 8. Valor de hemoglobina (g/dL) (a) e hematócrito (%) (b) respectivamente, com limites de normalidade (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	29
Figura 9. Valor de volume corpuscular médio (VCM) (fL) (a), hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) (b) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) (c) respectivamente, com limites de normalidade (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	33
Figura 10. Número de leucócitos (cel/ μ L) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	34
Figura 11. Número de neutrófilos segmentados (a), linfócitos (b), eosinófilos (c) e monócitos (d) (cél/ μ L) respectivamente, com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	39

Figura 12. Número de plaquetas (cél/ μ L) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	40
Figura 13. Concentração de proteína plasmática total (g/dL) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle do grupo controle e tratado com coumafós.....	41
Figura 14. Atividade enzimática sérica de alanina aminotransferase (ALT) (U/L) (a) e aspartato aminotransferase (AST) (U/L) (b) respectivamente, com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle do grupo controle e tratado com coumafós.....	44
Figura 15. Atividade enzimática sérica da fosfatase alcalina (U/L) (a) e da gama glutamil-transferase (GGT) (U/L) (b) respectivamente, com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.....	47
Figura 16. Concentração sérica de uréia (mg/dL) (a) e creatinina (mg/dL) (b) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle do grupo controle e tratado com coumafós.	50
Figura 17. Atividade da colinesterase sérica (U/L) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle do grupo controle e tratado com coumafós.....	53

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
bat/min	Batimentos por minuto
céls/ μ L	Células por microlitro
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DP	Desvio-Padrão
fL	Fentolitros
g/dL	Gramas por decilitro
GGT	Gama-glutamyl-transferase
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Média Ar.	Média aritmética
mov/min	Movimentos por minuto
OF	Organofosforado
Pg	Picogramas
PPT	Proteína plasmática total
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
U/L	Unidade por litro
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Ectoparasitas de Cães	2
2.1.1 Carrapatos	2
2.1.2 Pulgas	4
2.2 Medidas de Controle de Ectoparasitas	5
2.2.1 Controle mecânico	5
2.2.2 Controle através de agentes biológicos	5
2.2.3 Controle químico	5
2.3 Ectoparasiticidas	7
2.4 Considerações Sobre a Fisiologia da Sinapse Colinérgica	7
2.5 Antiparasitários Inibidores da Acetilcolinesterase	9
2.5.1 Organofosforados	9
2.5.2 Carbamatos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Local	15
3.2 Manutenção e Seleção dos Animais	15
3.3 Avaliação da Eficácia	15
3.3.1 Análise estatística	17
3.4 Avaliação da Segurança Clínica	17
3.4.1 Exame clínico	17
3.4.2 Exame hematológico e bioquímico	18
3.4.3 Análise estatística	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Eficácia	20
4.2 Avaliação da Segurança Clínica	21
4.2.1 Frequência respiratória	21
4.2.2 Frequência cardíaca	23
4.2.3 Temperatura corporal	24
4.2.4 Exame hematológico	25
4.2.5 Exame bioquímico	41
4.2.6 Avaliação da atividade enzimática da colinesterase sérica	50
5 CONCLUSÕES	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO	64
Anexo A. Quadro 3. Valores de referência para parâmetros de exame clínico, exame hematológico e bioquímico para cães.	64
Anexo B. FICHA DE EXAME CLÍNICO DETALHADO	65

1 INTRODUÇÃO

A venda de ectoparasiticidas para o controle de parasitas artrópodes em animais domésticos constitui um importante setor no mercado global de saúde animal.

Dentre as diferentes classes de fármacos destinados ao combate de ectoparasitas, uma das mais utilizadas são os organofosforados, disponíveis comercialmente sob diversas formas de apresentação, como coleiras, sabonetes, pós e ‘spot-on’; nas mais variadas formulações.

O mecanismo de ação destes fármacos se baseia em prolongar a atividade do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica através da inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (ASTROFF et al., 1998; HSIEH et al., 2001). Com isso, o inseto morre devido a uma superestimulação dos receptores colinérgicos e paralisia.

Contudo, o mau uso destes produtos pode causar grave intoxicação nos cães, podendo até mesmo levá-los a morte, principalmente pela ação desses agentes anticolinesterásicos ao nível de sistema nervoso central, digestório e respiratório. Além da acetilcolinesterase do sistema nervoso e junções neuromusculares, a colinesterase plasmática, embora menos atuante na hidrólise da acetilcolina, também pode ser útil no diagnóstico de intoxicação por tais compostos, por justamente também sofrer ação inibitória destes. Esta enzima também é conhecida como pseudocolinesterase (TECLES; CERÓN, 2001; CHEN et al., 2009).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do organofosforado coumafós sob a forma de apresentação de sabonete parasiticida, no controle de dois ectoparasitas de cães: *Rhipicephalus sanguineus* e *Ctenocephalides felis felis*, e verificar a segurança do produto frente a uma avaliação clínica dos animais, hematológica, bioquímica – hepática, através das enzimas ALT(TGP), AST(TGO), fosfatase alcalina e GGT; e função renal através das concentrações séricas de uréia e creatinina. Também se avaliou a atividade enzimática da colinesterase sérica dos cães, uma vez que, esta enzima representa um importante alvo de ação do produto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ectoparasitas de Cães

As infestações por parasitas externos frequentemente representam um desafio para os criadores de pequenos animais sob várias perspectivas, desde a identificação dos parasitas, passando pelas opções de tratamento, até as práticas de manejo para prevenir as infestações (ARTHER, 2009).

Dentre os ectoparasitas de importância médica e veterinária destacam-se as pulgas, importantes causadoras de dermatites alérgicas e transmissoras de patógenos (KNOLHOLFF; ONSTAD, 2007; ILG et al., 2010), os carrapatos, por também serem vetores de patógenos entre as espécies animais e também aos seres humanos (DANTAS-TORRES, 2007; CHOMEL, 2011); os ácaros causadores de sarnas (TAYLOR; COOP; WALL, 2007), e os piolhos (principalmente *Tricodectes canis*) (POLLMIER et al., 2002).

2.1.1 Carrapatos

Embora sejam considerados artrópodes de vida livre, os carrapatos necessitam se alimentar de sangue pelo menos durante uma fase da vida (FRITZ, 2009) e é justamente por este comportamento, que eles se tornam responsáveis por causar grandes perdas econômicas na pecuária, irritação intensa e doença de pele nos animais de companhia, além de serem preocupantes pela questão da saúde pública, por transmitirem zoonoses (TAYLOR, 2001).

Ao se alimentar, o carrapato introduz o aparelho bucal profundamente na pele do hospedeiro e regurgita grandes volumes de saliva, sua principal via de inoculação de patógenos (KAUFMAN, 2010). No processo de alimentação, eles causam: ação traumática, pela dilaceração de células e tecidos; ação mecânica pela compressão de células; espoliação direta pelo hematofagismo; ação tóxica pela inoculação de substâncias de alto peso molecular pela saliva; além da depreciação do couro e predisposição a miíases e abscessos (MASSARD; FONSECA, 2004).

Muitos patógenos virais, bacterianos e parasitários têm sido associados à transmissão por carrapatos, incluindo agentes recentemente identificados em humanos e animais domésticos, especialmente em cães (CHOMEL, 2011). Devido ao fato de serem hematófagos, os carrapatos estão em segundo lugar, abaixo apenas dos mosquitos, como fonte de transmissão de patógenos aos seres humanos, enquanto que, nos animais, eles ocupam o primeiro lugar (MASSARD; FONSECA, 2004; BISSINGER; ROE, 2010; CHOMEL, 2011).

Alguns dos gêneros de carrapatos que mais comumente parasitam cães são *Amblyomma* spp. e *Rhipicephalus* sp. (BLEGBERN; DRYDEN, 2009).

No ambiente rural brasileiro e na periferia das áreas urbanas, é comum a presença de cães parasitados por espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* spp., como *A. ovale* e *A. aureolatum*. As espécies deste gênero assumem grande importância na transmissão de patógenos, pois se utilizam de mais de um hospedeiro e possuem ampla distribuição geográfica. Trata-se de carrapatos de parasitismo eclético, cujas larvas podem ser encontradas sobre qualquer mamífero doméstico, silvestre, aves e no homem (MASSARD; FONSECA, 2004).

Outra espécie importante de carrapato, o “carrapato marrom do cão”, *Rhipicephalus sanguineus* (LATRIELLE, 1806), oriundo do continente africano, possui distribuição cosmopolita e os canídeos são considerados os únicos hospedeiros para seus três estágios parasitários (larva, ninfa e adulto) (SILVEIRA; PASSOS; RIBEIRO 2009), embora algumas vezes, o homem possa ser um hospedeiro ocasional deste parasita (DANTAS-TORRES, 2008).

Entre as doenças transmitidas pelo *R. sanguineus*, destacam-se a Borreliose (*Borrelia burgdoferi*), Rickettsiose (*Rickettsia rickettsi*), Erlichiose (*Erlichia* spp.), Babesiose (*Babesia* spp) e a Hepatozoonose (*Hepatozoon* spp) (BREMER et al., 2005; COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2008; CHOMEL, 2011), além da hipótese do envolvimento deste na transmissão de *Leishmania chagasi* (COUTINHO et al., 2005; PAZ et al., 2010).

Os carrapatos rígidos da família Ixodidae, a qual pertence *Rhipicephalus sanguineus*, se alimentam de sangue por um período de tempo prolongado, podendo permanecer fixados aos hospedeiros por vários dias antes de ficarem repletos de sangue. A prática do hematofagismo, em sucessivos e diferentes hospedeiros, em cada fase evolutiva (larva, ninfa e adulto) é o que permite a transmissão dos patógenos de um hospedeiro a outro, veiculados pelo sangue (FRITZ, 2009; BLEGBERN; DRYDEN, 2009).

Os carrapatos e os agentes transmitidos por eles possuem uma faixa zoogeográfica baseada no deslocamento de seu hospedeiro e dos fatores climáticos da região. Assim, com o aumento da mobilidade dos animais de estimação através de viagens, houve também um aumento na faixa zoogeográfica para muitas espécies de carrapatos (SHAW et al., 2001).

Os carrapatos da espécie *R. sanguineus* são pequenos, têm o corpo em formato alongado, possuem olhos e festões, são, geralmente, sem ornatos e possuem palpos curtos. A coxa I possui uma fissura profunda e as placas espiraculares são em formato de vírgula nos machos (DANTAS-TORRES, 2008). No contato com o hospedeiro, o carrapato usa suas quelíceras para perfurar a pele e seu hipostoma para ancorar-se. A fixação no hospedeiro é reforçada pela secreção de substâncias cimectantes, como a saliva, em torno do local da ferida (SONESHINE; LANE; NICHOLSON, 2002).

Tal como outros carrapatos de três hospedeiros, as larvas de *R. sanguineus* eclodem dos ovos depositados no meio ambiente, encontram um hospedeiro, alimentam-se, e depois saem deste para fazerem a muda para ninfa no ambiente. As ninfas, por sua vez, procurarão um novo hospedeiro, se alimentarão, e depois se desprenderão para realizarem a muda para adulto no ambiente. Adultos machos e fêmeas, em seguida, deverão encontrar um terceiro hospedeiro no qual irão se alimentar e copular. Fertilizadas, as fêmeas deverão deixar novamente o hospedeiro, repletas de ovos, para finalmente colocá-los no ambiente (LITTLE; HOSTETLER; KOCAN, 2007). Os machos se alimentam pouco e geralmente permanecem em seus hospedeiros, se alimentando repetidas vezes enquanto inseminam várias fêmeas (SONESHINE; LANE; NICHOLSON, 2002).

Os carrapatos ixodídeos geralmente desenvolvem-se em ambientes externos; porém, *Rhipicephalus sanguineus*, é comumente encontrados em ambientes internos e fechados. Por isso, é conhecido como o carrapato que infesta habitações humanas e canis na América do Norte. Embora pareça ser intolerante ao frio, *R. sanguineus* pode suportar áreas de baixa umidade, e persiste em regiões temperadas por habitar canis e casas. Estes carrapatos, quando no estágio de vida do ambiente, sobem paredes, podendo ser encontrados até no teto (BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

O controle do carrapato *R. sanguineus*, em certas áreas, foi baseado apenas no uso indiscriminado de produtos químicos, que conseqüentemente, levaram a uma seleção de cepas resistentes (DANTAS-TORRES, 2008). Por isso, se faz necessário que os veterinários exerçam o papel de educadores e informem aos proprietários de cães os problemas associados a um uso inadequado de acaricidas. Uma boa estratégia para o controle de carrapatos deve incluir métodos químicos e não-químicos e qualquer estratégia de controle deve se basear no conhecimento da ecologia do carrapato, pois só assim se observará uma melhora na eficiência do programa. Com isso, reduzem-se o risco de resistência acaricida e também a poluição ambiental (DANTAS-TORRES, 2008).

2.1.2 Pulgas

As pulgas, Classe Insecta, Ordem Siphonaptera, são insetos pequenos, achatados lateralmente e sem asas (RUST, 2005). Tanto os machos quanto as fêmeas adultas são ectoparasitas hematófagos obrigatórios de mamíferos e aves (BITAM et al., 2010).

Entre as espécies que afetam cães e gatos, *Ctenocephalides felis* (BOUCHÉ, 1835) é a espécie mais amplamente distribuída em todo o mundo (CARLOTTI; JACOBS, 2000; RUST, 2005), embora outras espécies como *C. canis*, *Pulex irritans*, *Echidnophaga gallinacea* e *Xenopsylla cheopis* possam também causar infestações em cães (CAÑÓN-FRANCO; PÉREZ-BEDOYA, 2010). Nos animais domésticos, a pulga *Ctenocephalides felis felis*, popularmente conhecida como “pulga do gato”, pode causar dermatite alérgica, devido às picadas (RUST, 2005), além de transmitirem agentes causadores de doenças como bactérias, filarídeos e cestóides (BLEGBERN; DRYDEN, 2009).

Os patógenos os quais até o momento é sabido serem transmitidos pela pulga *Ctenocephalides felis* são: bactérias (*Rickettsia typhi*, *Rickettsia felis*, *Bartonella* spp, *Mycoplasma haemofelis*, e em casos raros, *Yersinia pestis*); o filarídeo nematóideo não patogênico *Dipetalonema reconditum*; e cestóides, *Dipylidium caninum* e *Hymenolepis nana* (BLEGBERN; DRYDEN, 2009).

Adicionalmente, a ocorrência de populações não-controladas de pulgas em cães e gatos pode ainda provocar prurido intenso, levando a automutilação e, anemia (CARLOTTI; JACOBS, 2000). Em alguns indivíduos, a exposição à picadas de pulgas, eventualmente, leva a uma condição mais séria de dermatite alérgica, também conhecida como hipersensibilidade à picada de pulga (DAP). Uma vez que tenha ocorrido a sensibilização, o recrudescimento das lesões pode ser desencadeado apenas por um pequeno número de picadas, embora a sensibilidade varie entre os indivíduos (CARLOTTI; JACOBS, 2000).

Por serem insetos holometabólicos, as pulgas completam o ciclo de ovo a adulto através de vários estágios larvais e um estágio pupal, para enfim, chegarem à fase adulta. A conclusão de todo ciclo de vida, de ovo a adulto, pode variar significativamente entre as espécies (BITAM et al., 2010).

Devido ao fato de somente 5% da população de pulgas estarem sobre o hospedeiro e 95% encontrarem-se no ambiente (LINARDI; GUIMARÃES, 2000), um tratamento ocasional com pulguicidas pode ser adequado para manter sob controle apenas uma simples pulicose, mas esta abordagem não quebraria todo o ciclo epidemiológico. A presença de ovos, larvas e pupas no ambiente doméstico garantiriam que um animal, mesmo tratado, se tornasse novamente infestado (CARLOTTI; JACOBS, 2000).

As larvas recém-emergidas dos ovos penetram pela trama dos carpetes e estofados, em móveis e mobílias, em fendas e rachaduras. Novos adultos podem aparecer em duas semanas, mas a emergência da pupa pode demorar por períodos superiores a cinco meses. Logo, uma nova infestação pode ocorrer assim que o efeito residual do pesticida tenha cessado (CARLOTTI; JACOBS, 2000).

Durante os últimos 10 anos, o controle de pulgas em cães e gatos foi revolucionado por inseticidas sistêmicos e tópicos como lufenuron, fipronil, imidacloprid, e, mais recentemente a selamectina (RUST, 2005). Atualmente, são descritos vários grupamentos químicos disponíveis para o controle de *C. f. felis*, como piretróides, organofosforados, carbamatos, fenilpirazoles, nitroguanidinas, neonicotinóides e lactonas macrocíclicas, além dos reguladoras de crescimento (SCOTT et al., 2002).

A frequência de tratamentos necessários para um controle de pulgas, a longo prazo, varia entre os diferentes compostos e formulações. Porém, os intervalos de tratamento ficam normalmente na faixa de um a seis meses (COOP, 2002).

2.2 Medidas de Controle de Ectoparasitas

O controle de ectoparasitas em animais tem sido, em grande parte, baseado no uso de substâncias químicas, com os produtos para o controle de pulgas representando a maior parcela deles (TAYLOR; COOP; WALL, 2007). Porém, o desenvolvimento de abordagens integradas, nas quais as táticas de gerenciamento adotariam os parasiticidas como um componente a ser utilizado em circunstâncias necessárias, pode ser a via mais adequada para se alcançar este objetivo (WALL, 2007).

2.2.1 Controle mecânico

Além do controle químico, também é fundamental que se faça um controle mecânico a fim de impedir a proliferação de parasitas, pois, antes de introduzir os compostos químicos, as recomendações para o controle de pulgas consistem no tratamento do ambiente, interno e externo – onde os ovos, larvas e pupas residem – e dos animais, que albergam a fase adulta do parasita (RUST, 2005).

Dentre as medidas a serem tomadas incluem-se a catação manual, a penteação frequente (LINARDI; GUIMARÃES, 2000), o uso de aspirador de pó, a lavagem do piso e da cama do animal, o manejo adequado da vegetação e solo, e a restrição do contato do cão com outros animais, externos ao domicílio (MELO, 2006).

2.2.2 Controle através de agentes biológicos

O uso de patógenos biológicos de ocorrência natural, como nematóides, bactérias, fungos e vírus, oferecem uma abordagem particularmente interessante ao manejo de ectoparasitas. O uso de fungos patogênicos para o controle de carrapatos tem sido amplamente estudado por muitos pesquisadores (ANGELO et al., 2010; FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2011; FERNANDES et al., 2011; PERINOTTO et al., 2011).

Além disso, atualmente, também tem se investido em pesquisas para o estudo de vacinas através de uma compreensão sobre os linfócitos T e seus processos imunomediados, baseadas em técnicas de “Western blotting” e imunolocalização. Espera-se que estas pesquisas sirvam de ferramentas para o estabelecimento de uma imunidade aos ectoparasitas, como já vem sendo demonstrado para alguns parasitas de cavalos e ovelhas (COOP, 2002).

Através de uma tecnologia de recombinação produz-se uma vacina baseada em uma molécula funcionalmente importante presente no parasita. Assim, ao se alimentar, os anticorpos produzidos no hospedeiro atuam no parasita, levando-o à morte ou a uma redução substancial do número de ovos produzidos. Uma desvantagem desta abordagem, por exemplo, é que a pulga precisaria picar o animal para se tornar exposta ao anticorpo, o que tornaria esta estratégia não adequada para o tratamento da DAP (CARLOTTI; JACOBS, 2000).

2.2.3 Controle químico

A aplicação de inseticidas naturais, principalmente de origem vegetal, precede de um longo período de tempo, antes dos inseticidas sintéticos. Em certas partes da Europa, pelo ano de 1690, as plantas já eram pulverizadas com extrato de tabaco; e no período entre 1900 e 1940, a anabasina, nicotina, piretrinas, rotenona, e quássia eram usadas, em associação aos inseticidas inorgânicos (MATOLCSY, 1988).

Mas o primeiro grande marco na história dos pesticidas sintéticos veio com a descoberta, no século XIX, do kerosene e do “verde de Paris” para combater o escaravelho da barata. Até o início da Segunda Guerra Mundial, a seleção de inseticidas limitava-se aos

compostos citados anteriormente, mas foi com o advento da guerra que se conheceu as propriedades dos organoclorados, dos quais o DDT é o mais conhecido (SANTOS, 2002). Contudo, devido a persistência e biomagnificação destes pesticidas na cadeia alimentar, seu uso entrou em declínio e logo eles foram substituídos pelos inibidores da acetilcolinesterase (SHARMA, 2006).

E assim, posteriormente, inúmeras novas formulações, com diferentes mecanismos de ação foram sintetizadas. Na Tabela 1, encontram-se algumas classes farmacológicas de parasiticidas com seus respectivos mecanismos de ação.

Tabela 1. Classes e mecanismos de ação de pesticidas de uso comum no controle de ectoparasitas.

Classe	Exemplo	Modo de ação
Piretróides	Permetrin	“Vazamento” dos canais de sódio de neurônios
Organoclorados – 1	DDT	“Vazamento” dos canais de sódio de neurônios
Organoclorados – 2	Dieldrin	Bloqueio dos canais de cloreto GABA-érgicos
Organofosforados	Coumafós	Inibição da acetilcolinesterase
Carbamatos	Carbaryl	Inibição da acetilcolinesterase
Formamidinas	Amitraz	Ligação a receptores de octopamina
Spinosinas	Spinosad	Agonista do receptor nicotínico colinérgico
Neonicotinóides	Imidacloprid	Agonista do receptor nicotínico colinérgico
Fenilpirazóis	Fipronil	Bloqueio dos canais de cloreto GABA-érgicos
Avermectinas	Ivermectina	Ativação de canais de cloreto

Fonte: (KNOLHOFF; ONSTAD, 2007).

Em suma, muitos dos produtos químicos utilizados para controle de ectoparasitos de importância veterinária atuam como neurotoxinas, seletivamente no sistema nervoso de artrópodes. No entanto, elas apresentam uma série de inconvenientes, como o desenvolvimento de resistência por parte dos ectoparasitas e preocupações quanto à segurança humana e ambiental (COOP, 2002).

A busca por compostos mais seguros tem sido difícil devido ao fato de haver um número limitado de “alvos” conhecidos nos artrópodes e o custo para pesquisa e desenvolvimento de compostos com novos modos de ação ser elevado. Desenvolvimentos recentes incluem a introdução dos reguladores de crescimento de insetos e uma melhoria nos métodos de aplicação dos produtos (COOP, 2002).

Para preservar a viabilidade de uso dos compostos inseticidas é importante que se criem programas de gestão de manejo de parasitas com base em uma multiplicidade de técnicas, onde o uso de inseticidas deve ser integrado de forma racional a fim de evitar o surgimento da resistência (WALL, 2007).

Além dos ectoparasiticidas, o uso de repelentes também é considerado uma importante medida química de proteção contra carrapatos (BISSINGER; ROE, 2010). Nesta categoria, existem dois tipos de repelência: um que consiste no fato de que os parasitas são desencorajados a irem ao hospedeiro pelo “vapor” do composto, como exemplo, o óleo de citronela. E um segundo tipo, no qual o parasita precisaria entrar em contato primeiro com a substância, para depois sair, mecanismo exibido por alguns piretróides sintéticos (CARLOTTI; JACOBS, 2000).

Atualmente, reconhecem-se propriedades repelentes em várias substâncias, oriundas de diversas matérias-primas (principalmente plantas) (BISSINGER; ROE, 2010). O repelente ideal deve oferecer proteção contra um amplo espectro de artrópodes hematófagos por pelo menos 8 horas, não ser tóxico, não ser irritante, ser inodoro e não ser oleoso (BISSINGER; ROE, 2010).

2.3 Ectoparasiticidas

O termo “Pesticida”, tal como definido pela “*Federal Insecticide, Fungicide, and Raticide Act*” representa qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir, repelir ou reduzir qualquer praga, como insetos, roedores, nematóides, fungos, plantas daninhas, ou outras formas de plantas terrestres ou aquáticas, vida animal ou vírus, bactérias ou outros organismos, que se declare como sendo uma praga; além de toda substância ou mistura de substâncias destinadas para o uso como um regulador vegetal, desfolhante ou dessecante (ROSE; HODGSON; ROE, 1999).

O uso de pesticidas é validado por suas muitas contribuições para a sociedade, ainda que por sua própria natureza, muitas vezes, os pesticidas possam apresentar também efeitos deletérios. Inseticidas e raticidas estão entre os pesticidas com maior probabilidade de produzir toxicidade aguda em humanos e animais selvagens, mas, muitos dos novos inseticidas apresentam maior seletividade aos insetos que os mais antigos (ROSE; HODGSON; ROE, 1999).

Os produtos químicos disponíveis utilizados no tratamento de ectoparasitas de importância veterinária podem agir tanto sistemicamente, baseando-se na captação do composto pelos tecidos dos hospedeiros, quanto por contato direto com o parasitas-alvo após a aplicação externa. Devido às diferenças no comportamento farmacocinético e na captação dos locais de aplicação, diferentes formulações de uma preparação de drogas podem ser indicadas para diferentes parasitas-alvo (TAYLOR, 2001).

Os ectoparasiticidas podem ainda ser classificados de acordo com a classe farmacológica ao qual pertencem. Os três grupos principais que compuseram a base dos ectoparasiticidas foram os organoclorados, organofosforados e piretróides sintéticos (TAYLOR; COOP; WALL, 2007). Os demais grupos incluem os carbamatos, formamidinas, triazinas, benzil-benzoatos, avermectinas e milbemicinas e os compostos que afetam o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, que baseados em seus mecanismos de ação, podem ser divididos em inibidores da síntese de quitina e análogos do hormônio juvenil (CARLOTTI; JACOBS, 2000; TAYLOR; COOP; WALL, 2007).

Nos últimos anos, assistimos, então, à descoberta e desenvolvimento de vários novos pesticidas inseticidas e acaricidas, projetados especificamente por seus fabricantes para matar as pragas de maneira mais rápida e segura para os animais e pessoas. Os mecanismos de ação destes pesticidas exploram diferenças fisiológicas entre os insetos e mamíferos, resultando em baixa toxicidade para o hospedeiro. Com isso, a incidência de intoxicação associada ao uso destes novos ectoparasiticidas em cães e gatos parece estar mais limitada. Comparado aos inseticidas mais agudamente tóxicos como os organofosforados, carbamatos e metais pesados, bem como com os problemas ambientais da bioacumulação associados ao uso de alguns inseticidas organoclorados, os novos inseticidas, parecem aliviar esses problemas conhecidos enquanto continuam a fornecer atividade inseticida satisfatória (HOVDA; HOOSER 2002).

2.4 Considerações Sobre a Fisiologia da Sinapse Colinérgica

A acetilcolina (hidróxido de acetil-etanol-trimetilamônio) é um neurotransmissor liberado nas junções neuromusculares, das sinapses pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo e nas terminações nervosas pós-ganglionares parassimpáticas. Ela interage com

dois tipos de receptores colinérgicos: nicotínicos e muscarínicos e sua função pode ser excitatória ou inibitória, dependendo dos receptores (REY, 2008).

A acetilcolina é sintetizada no axônio terminal do neurônio motor a partir da colina e acetil coenzima-A, sob a influência da colina-O-acetiltransferase (POPE; KARANTH; LIU, 2005). Após serem sintetizadas, muitas moléculas de acetilcolina permanecem livres no citoplasma, mas uma pequena quantidade é armazenada em vesículas, contendo de 5.000 a 10.000 moléculas (ARROWSMITH, 2007).

À medida que se liga aos seus receptores pós-sinápticos, os canais iônicos ligante-dependentes se abrem, promovendo um influxo de Na^+ para o interior da célula muscular, causando a despolarização da membrana pós-sináptica (BEUGNET, 2004; CUNNINGHAM, 2004; GUYTON; HALL, 2006). O influxo de íons sódio na fibra muscular, quando os canais colinérgicos se abrem, causa variação do potencial elétrico no interior da fibra, no local da placa motora, criando um potencial local chamado potencial de placa motora (GUYTON; HALL, 2006). Os potenciais de ação que chegam à membrana da célula muscular levam à contração ou encurtamento mecânico da célula. Quando esta contração é simultânea ao encurtamento de muitas células musculares, ocorre o movimento do corpo (CUNNINGHAM, 2004).

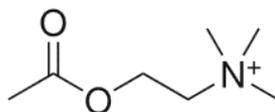


Figura 1. Fórmula estrutural da molécula de acetilcolina

Uma vez liberada na fenda sináptica, a ACh pode ser hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE); ligar-se transitoriamente aos receptores para acetilcolina ou ainda difundir-se pela fenda sináptica e ser hidrolisada por (pseudo)colinesterases inespecíficas (ARROWSMITH, 2007).

No sangue dos mamíferos existem pelo menos dois tipos de colinesterases (ChE): a colinesterase eritrocitária (CE3.1.1.7), também conhecida como acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira (TECLES et al. 2000; WILSON, 2001), presente também em uma grande variedade de tecidos, tais como cérebro, músculo esquelético, gânglios autônomos, tecido cardíaco (MARABLE et al., 2007) músculos lisos dos brônquios e bexiga e nas células efectoras das glândulas salivares (ABDELSALAM, 1987), e a colinesterase plasmática (PsChE; CE3.1.1.8), também conhecida como pseudocolinesterase ou butirilcolinesterase (BuChE) (TECLES et al. 2000; WILSON, 2001) encontrada no fígado, coração, rim e plasma (ABDELSALAM, 1987).

A acetilcolinesterase pode hidrolisar a acetilcolina, mas não outros ésteres de colina. Enquanto que a pseudocolinesterase pode hidrolisar outros ésteres de colina, tais como butiril e propionilcolina, bem como a acetilcolina (TECLES et al., 2000; WILSON, 2001).

Embora a BuChE também seja encontrada nas sinapses, placas motoras e fibras musculares, juntamente com a AChE, sua atividade é restrita ao soro (WILSON, 2001), e mostrou ser mais sensível que a acetilcolina quando sob administração de coumafós em cães (TECLES et al., 2000).

A atividade da colinesterase no sangue é comumente usada para avaliar os efeitos colaterais indesejáveis após a exposição aos compostos organofosforados e carbamatos (DELLINGER; MOSTRÖM, 1988; CAVALIERE et al., 1996; CHEN et al., 2009) embora a AChE neural, principalmente em se tratando de organofosforados, seja geralmente aceita como um alvo toxicológico desses inseticidas (CAVALIERE et al., 1996; GARCIA; ASCHNER; SYVERSEN, 2006; MARABLE et al., 2007), pois estes compostos pesticidas

inibem a ação desta enzima (CHARPENTIER et al., 2000; GARCIA; ASCHNER; SYVERSEN, 2006). Consequentemente, a acetilcolina acumulada na fenda sináptica se liga a ambos os receptores muscarínicos e nicotínicos colinérgicos, levando à toxicidade (GARCIA; ASCHNER; SYVERSEN, 2006).

Atualmente, os inibidores da colinesterase também têm sido utilizados no tratamento de doenças em seres humanos, no controle de insetos, e mais notoriamente como agentes de guerra química e armas do terrorismo (POPE; KARANTH; LIU, 2005).

2.5 Antiparasitários Inibidores da Acetilcolinesterase

2.5.1 Organofosforados

Os organofosforados representam uma ampla classe de substâncias químicas utilizadas como pesticidas em todo o mundo (KENDALL, 1961; CHARPENTIER et al., 2000; HSIEH et al., 2001; RAHIMI; ABDOLLAHI, 2006; STARKS et al., 2011). Seu modo de ação, bem como o mecanismo pelo qual a intoxicação se manifesta nos mamíferos, é através da fosforilação, com subsequente inativação da acetilcolinesterase. A inativação desta enzima faz com que haja um acúmulo de acetilcolina nos terminais sinápticos do sistema nervoso central e periférico permitindo então uma superestimulação dos receptores colinérgicos (ASTROFF et al., 1998; HSIEH et al., 2001). Assim, eles causam paralisia e morte dos insetos em virtude da inibição irreversível da enzima e do acúmulo da acetilcolina (BEUGNET, 2004; GUPTA, 2006).

Os OFs, de modo geral, se apresentam com uma estrutura característica básica, como ilustrado na Figura 2:

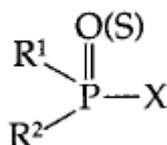


Figura 2. Estrutura básica de um organofosforado. (Fonte: ROSE; HODGSON; ROE, 1999).

De acordo com a fórmula estrutural representada na Figura 2 acima, R1 e R2 poderiam ser substituídos por ramificações (geralmente grupos alquil ou aril) ligadas diretamente a um átomo de fósforo ou uma ponte –O– ou –S–; a ramificação X seria responsável por subdividir os organofosforados em até quatro categorias principais, onde o X poderia ser substituído por um nitrogênio quaternário; Flúor; Cianato, tiocianato, cianeto ou um halogênio, que não fosse o flúor; ou ainda um radical alquil, alcóxi, arila ou heterocíclico (ROSE; HODGSON; ROE, 1999).

Frente a estas diversas possibilidades de arranjos estruturais, tem-se que dentro desta classe encontram-se um grande número de compostos: clorfenvinfós, coumafós, crotoxifós, crufomato, citioato, diazinon, diclofention, diclorvós, fenthion, iodofenfós, malathion, phosmet, propetanfós, ronnel, tetraclorvinfós e triclорfon (GUPTA, 2006; TAYLOR; COOP; WALL, 2007).

Rose; Hodgson; Roe (1999) e Gupta (2007) relataram que o primeiro composto organofosforado sintetizado foi o pirofosfato de tetraetila, em 1854, por Philippe de Clermont e que, em 1932, Lange e Kruger descreveram a síntese de dimetilfosforofluoridatoetilico, mas somente mais tarde, Gerhard Schrader, durante a Segunda Guerra Mundial, observou que estes poderiam ser usados como inseticidas.

Schrader foi o primeiro a descobrir as propriedades inseticidas desses compostos ao desenvolver alguns dos primeiros inseticidas organofosforados, o schradan e o

tetraetilpírofosfato (TEPP), os primeiros a serem comercializados (ABDELSALAM, 1987; ROSE; HODGSON; ROE, 1999; GUPTA, 2007).

Assim, desde a Segunda Guerra Mundial, estima-se que milhares de organofosforados tenham sido sintetizados para diversos fins, sendo a maioria deles, usados como pesticidas. Já outros, usados como agentes que atuam no sistema nervoso, ou como parasiticidas na medicina veterinária (ABDELSALAM, 1987; HILMAS; ADLER; BASKIN, 2006; GUPTA, 2006).

Os compostos organofosforados também são conhecidos por inibir esterases que não são colinesterases, como carboxilesterases (as aliesterases) e também outras enzimas como a tripsina, a quimiotripsina e a tipase do leite. Eles também interferem com o metabolismo hepático dos hormônios esteróides e provocam a liberação de esteróides adrenais e catecolaminas (ABDELSALAM, 1987).

No Quadro abaixo são apresentados os grupamentos químicos de alguns organofosforados encontrados atualmente no mercado sob a forma de sprays, pós, "spot-on" e colares, segundo Beugnet (2004):

Quadro 1. Classes e subclasses de alguns organofosforados.

Grupamento químico	Produto
Fosforotioatos	clorpirifós, coumafós, citioato, diazinon, fenitrothion, fenthion, malathion
Fosforamidas	propetanfós e triclofon
Fosfatos	diclorvós

Fonte: (BEUGNET, 2004)

A ação de um composto químico num determinado período de tempo é regulado por sua farmacocinética: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. Estes processos diferem entre as espécies e indicam diferentes reações quando expostas aos anticolinesterásicos (OEHME; MANNALA, 2001; GARCIA, 2006).

Muitos dos compostos OFs são absorvidos rápida e completamente e distribuídos difusamente pelos sistemas corporais, garantindo amplo espectro de efeito inseticida. Entretanto, estes compostos possuem meia-vida curta (FLEMING, 1981; OEHME; MANNALA, 2001; BEUGNET, 2004).

Após a absorção, os compostos OFs sofrem diversas reações de biotransformação. Uma vez que estes, em sua composição, tenham alto caráter lipofílico, para facilitar a penetração no inseto, as primeiras reações de biotransformação são direcionadas principalmente à formação de compostos mais polares (JOKANOVIC, 2001).

A ativação do organofosforado pode ser definida como a transformação metabólica de compostos inativos a compostos ativos e a conversão dos ativos a outros compostos também ativos. A desintoxicação inclui sua biotransformação em metabólitos não-tóxicos. Esta etapa, também chamada de degradação, é a reação mais significativa no metabolismo destes compostos (JOKANOVIC, 2001).

Os organofosforados, de um modo geral, se acumulam rapidamente no tecido adiposo, fígado, rins e glândulas salivares. Os fosforotioatos ($P = S$), grupo ao qual pertence o coumafós (e outros como diazinon, parathion e bromofós), são mais lipofílicos que os fosfatos ($P - O$), como diclorvós, e por isso, são armazenados extensivamente na gordura, o que pode contribuir para uma intoxicação mais prolongada com recaída clínica após aparente recuperação, fato observado nas intoxicações por esses inseticidas (MARRS, 2006).

Uma característica marcante destes fármacos é que eles persistem na pele por um período razoável, embora seus resíduos durem pouco tempo no tecido do animal (OEHME;

MANNALA, 2001; BEUGNET, 2004; TAYLOR; COOP; WALL, 2007). Alguns deles têm a habilidade de agirem sistemicamente, ao serem administrados pela via oral, parenteral ou mesmo *pour-on*, mas os níveis plasmáticos se mantêm por apenas 24 horas (TAYLOR; COOP; WALL, 2007).

Outra diferença marcante é que os fosfatos são biologicamente ativos, enquanto que os fosforotioatos necessitam de uma bioativação ao metabolito correspondente (Oxon) para se tornarem biologicamente ativos. Como consequência, as características da intoxicação podem ser adiadas, até que ocorra a oxidação do fosforotioato para gerar os primeiros oxons (JOKANOVIC, 2001; MARRS, 2006).

Por fim, estes oxons, que inibem a acetilcolinesterase podem, em seguida, ser desativados por hidrolases, como carboxilesterases, e esterases, como paraoxonase. Os compostos organofosforados sofrem ainda outras transformações mediadas pelo citocromo P450, que não resultam na produção de um metabólito ativo, incluindo desalquilação oxidativa e desarilação (MARRS, 2006).

As enzimas envolvidas na fase de ativação são: enzimas do complexo citocromo p450, NADPH-citocromo p450-redutase e monoxigenases. Já na fase de degradação, as enzimas participantes são: hidrolases triéster fosfóricas, carboxilesterases e sistema redox-glutationa. À medida que se formam os metabólitos polares e estes são conjugados a substratos endógenos como glicuronídeos, sulfatos, acetatos e aminoácidos, formam-se produtos hidrossolúveis que podem ser prontamente excretados pela urina (JOKANOVIC, 2001).

Embora a absorção dérmica de compostos OF tenda a ser lenta, o envenenamento grave pode acontecer se a exposição for prolongada. O grau de absorção depende do tempo de contato com a pele, a lipofilicidade do agente envolvido e a presença de solventes e emulsificantes na composição, que podem facilitar a absorção (MARRS, 2006). A sensibilidade do animal ao pesticida pode variar ainda em relação à idade, pois diferenças toxicocinéticas entre diferentes grupos de faixas etárias podem contribuir para sensibilidades distintas, com diferenças na biotransformação como sendo o maior fator (POPE, 2001).

A exposição à compostos organofosforados pode produzir efeito localizado no sítio de contato ou efeitos sistêmicos. O efeito local é melhor visto na ausência de outros sinais indicativos de envenenamento. Sobre a pele, pode-se observar fasciculações, além de lesões cutâneas localizadas, causadas pela descamação excessiva do epitélio queratinizado. A toxicidade é principalmente aguda ou subaguda, contudo, pode ser crônica, mas apenas se a exposição for repetida, pois estes compostos são rapidamente metabolizados e excretados (ABDELSALAM, 1987).

Os sinais clínicos de intoxicação começam quando pelo menos 50% da acetilcolinesterase corporal é inativada (ENZO, 2006) e são classificados como muscarínicos, nicotínicos e centrais (DECLEMENTI, 2007).

Os sinais muscarínicos são devido aos efeitos em nervos pós-ganglionares e efetores autonômicos. Os sinais nicotínicos são devido aos efeitos sobre os nervos pré-ganglionares e somáticos, o que resultam em estimulação seguida de fraqueza, depressão e paralisia dos músculos esqueléticos (DECLEMENTI, 2007). E os sinais centrais são devido ao efeito direto sobre o SNC produzido pelos lipídios organofosforados solúveis (ABDELSALAM, 1987).

A hiperestimulação colinérgica produz uma gama de sinais de intoxicação, sendo os primeiros sintomas resultantes da estimulação parassimpática, como bradicardia, miose, diarreia, micção, lacrimejamento e salivação (GARCIA, 2006). A super-estimulação das junções neuromusculares pode resultar em espasmos e, em doses mais elevadas, paralisia (ROSE; HODGSON; ROE, 1999; GARCIA, 2006).

Na intoxicação aguda, ocorre principalmente insuficiência cardiorrespiratória por comprometimento do sistema nervoso autônomo, o que leva a uma miopatia caracterizada por degeneração de células musculares, comprometendo, sobretudo, a musculatura respiratória (CAVALIERE et al., 1996).

Hilmas; Adler; Baskin (2006) relataram toxicidade pulmonar por organofosforados associada à inalação de aerossóis ou líquidos. A ocorrência da intoxicação por tais compostos se baseia no aumento da secreção glandular pelo trato respiratório, broncoconstrição, efeito nicotínico sobre os músculos respiratórios torácicos e do pescoço, causando dificuldade respiratória, e efeito tóxico ao nível do controle central da respiração.

Os organofosforados podem interferir também na homeostase da glicose, levando a hiperglicemia, através de uma série de mecanismos, os quais incluem-se estresse oxidativo, inibição da paraoxonase, pancreatite, estimulação adrenal e distúrbio no metabolismo hepático do triptofano (RAHIMI; ABDOLLAHI, 2006).

Apesar de alguns estudos sugerirem que os pesticidas anticolinesterásicos sejam imunotóxicos, de modo geral, o que se observa é que pode haver supressão ou aumento da imunidade mediada pelos pesticidas anticolinesterásicos. Tais alterações são observadas apenas nas situações em que é possível observar sinais sistêmicos de intoxicação e, neste caso, a alteração imunológica pode ser atribuída ao estresse sistêmico (SHARMA, 2006).

No Quadro 2, a seguir, são descritos alguns sinais nervosos sistêmicos decorrentes da intoxicação.

Quadro 2. Sinais clínicos mais comumente observados decorrentes da intoxicação por drogas anticolinesterásicas em cães.

EFEITOS	SINAIS E SINTOMAS	REFERÊNCIA
MUSCARÍNICOS	Dor abdominal, diarreia	ABDELSALAM, 1987; ROSE et al., 1999
	Sialorréia, lacrimejamento, secreção nasal, bradicardia, miose, sudorese, tosse, vômito, micção, hipermotilidade gastrintestinal e broncoconstrição.	MONICI, 2009
	Dispnéia, broncoespasmo, cianose.	ABDELSALAM, 1987; CAVALIERI et al., 1996
NICOTÍNICOS	Espasmos musculares e fraqueza, levando à paralisia.	ROSE et al., 1999 MONICI, 2009
	Convulsões, hipertonicidade.	MONICI, 2009
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	Convulsões, tremores.	ROSE et al., 1999 GARCIA, 2006
	Hipotermia, dor de cabeça.	GARCIA, 2006
	Depressão dos centros respiratórios no cérebro.	GARCIA, 2006 MONICI, 2009
	Ansiedade, inquietação, tontura, coma e morte.	MONICI, 2009

A atividade da AChE é rotineiramente medida no sangue ou plasma para o diagnóstico de envenenamento por organofosforados (TECLES et al. 2000; TECLES; CERÓN, 2001; CHEN et al., 2009), mas a estimativa da atividade da AChE em tecidos também podem fornecer provas úteis de exposição aos OFs. O cérebro é o órgão principal que dá uma indicação precisa, mas a atividade da AchE no fígado, rim, coração e nas glândulas salivares também poderiam ser usadas como um índice de envenenamento por tais compostos (ABDELSALAM, 1987). Para a avaliação da atividade da colinesterase sérica, o substrato

butirilcolina demonstrou ser útil na determinação da atividade desta enzima em cães, segundo metodologia descrita por Tecles e colaboradores (2000), pois além de ser mais predominante no plasma sanguíneo que a acetilcolina, apresentou também sensibilidade superior à esta mediante o uso do anticolinesterásico.

Segundo Tecles e colaboradores (2000) e Tecles e Cerón (2001), a utilização dos dois substratos (acetil e butirilcolina) é recomendado para análises de colinesterase no sangue total na animais domésticos, pois permite a monitorização de ambas as atividades de acetil- e butirilcolinesterases, respectivamente. Conseqüentemente, há uma detecção mais precisa da exposição aos compostos anticolinesterásicos.

O diagnóstico de envenenamento por pesticidas OFs deve ser baseado na história do paciente, apresentação clínica e exames laboratoriais. Em um paciente com uma história positiva, o odor típico na respiração, sintomas característicos, e redução da atividade colinesterásica plasmática e eritrocitária, o diagnóstico não será difícil de se estabelecer. Mas infelizmente, o histórico é muitas vezes inalcançável. Além disso, as características clínicas de envenenamento podem não ser reconhecidas como tal se o paciente se apresenta, por exemplo, com um bloqueio cardíaco, gastroenterite, convulsões ou cetoacidose. A consciência dessa diversidade de apresentação é o primeiro passo para um diagnóstico preciso (MARRS, 2006).

Segundo Marrs (2006), uma intervenção bem sucedida no caso de intoxicação por OFs depende da compreensão dos mecanismos de toxicidade; do diagnóstico preciso; da gravidade da intoxicação; da manutenção das funções vitais; do uso adequado dos medicamentos de eleição para reversão dos sinais clínicos (atropina, oxima e diazepam) e da minimização da absorção do pesticida.

Antes de se instituir a terapia com antídotos para a intoxicação, os animais monogástricos, tais como o cão, devem receber lavagem gástrica (SHELTON, 2002; GUPTA, 2006). Também pode ser dado carvão ativado para impedir uma maior absorção do inseticida (GUPTA, 2006; CHEN et al., 2009). Além disso, os animais expostos a inseticidas pela via dérmica, devem ser banhados com água e a fluidoterapia intravenosa é sempre benéfica (GUPTA, 2006).

Deve-se utilizar também o sulfato de atropina (0,2 a 2 mg/kg) para bloquear os efeitos muscarínicos centrais e periféricos causados pelos OFs (CABRINI et al., 2007; DECLEMENTI, 2007; THIERMANN et al., 2011). O fármaco Pralidoxima (Contrathion®)¹ na dose de 10 a 15 mg/kg pode ser utilizado para regenerar a acetilcolinesterase e aliviar os sinais nicotínicos, porém este deverá ser instituído dentro de 24 a 48 horas, pois o complexo organofosforado/acetilcolinesterase pode se tornar não-responsivo ao regenerador em consequência do “envelhecimento” desse complexo (CABRINI et al., 2007).

O coumafós é um pó ligeiramente acastanhado, com odor fraco desagradável; derrete a 90-92°C, é estável à água e ao calor moderado. É solúvel em solventes aromáticos, um pouco solúvel em álcoois e cetonas e insolúvel em água (INCHEM, 1972).

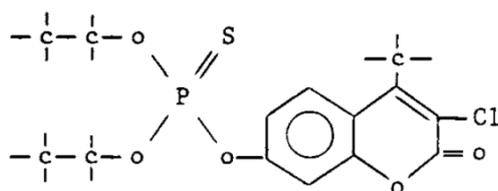


Figura 3. Fórmula estrutural da molécula de coumafós (UNGER, 1996).

¹ Contrathion® (Sanofi-Aventis Farmacêutica LTDA)

Este organofosforado atua tanto como inseticida quanto anti-helmíntico, pois possui ação sistêmica. Nos Estados Unidos, foi registrado para o controle de alguns parasitas como piolhos, sarnas, moscas e carrapatos, e de ectoparasitas de bovinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e aves domésticas. Também é utilizado, muitas vezes, para a limpeza dos carrapatos de bovinos de áreas de quarentena na fronteira do México e também no tratamento de bicheiras. Formulações especiais pré-misturadas são disponíveis para uso em alimentos para o controle de endoparasitas em aves e bovinos (LANCASTER; MEISCH, 1986).

Quanto à sua eficácia, Sobrinho; Silva e Linhares (1997) demonstraram que a eficácia do coumafós para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi de 91,2%. Entretanto, Bicalho et al. (2001) demonstraram que exceto para as ninfas e fêmeas adultas não alimentadas expostas ao composto, todos os outros estádios de carrapato foram sensíveis à formulação testada.

Davey, George, Miller (2003) ao testarem diferentes concentrações de coumafós em uma cepa de *Rhipicephalus (B.) microplus*, constataram que, em relação à cepa testada, o coumafós também demonstrou não ser eficaz no controle do carrapato. Enquanto que, Borges et al. (2007) também verificaram baixa eficácia para o coumafós em relação às cepas testadas em Goiânia (GO) e os pesquisadores atribuíram este resultado à resistência dos carrapatos a este princípio ativo.

2.5.2 Carbamatos

Os carbamatos constituem o grupo mais versátil de pesticidas, podendo encontrar-se compostos deste tipo atuando como pesticidas, herbicidas, fungicidas e até antibacterianos (SANTOS, 2002). Eles estão intimamente relacionados com os organofosforados, e como estes, também agem como anticolinesterásicos (TAYLOR, 2001). Porém, comparados aos OFs, os carbamatos são relativamente mais recentes (GUPTA, 2006) e contrariamente aos compostos OFs, causam um bloqueio espontaneamente reversível na enzima acetilcolinesterase sem alterar sua conformação (TAYLOR, 2001).

Embora os sintomas de envenenamento sejam quase idênticos para OFs e carbamatos, há algumas diferenças significativas entre eles. Por exemplo, em contraste com os OFs, as doses de carbamatos responsáveis por causar os primeiros sintomas tóxicos são bem distantes da dose necessária para causar a morte dos animais. Isto se deve às diferenças entre as propriedades de ligação dos OFs e dos carbamatos à acetilcolinesterase (ROSE; HODGSON; ROE, 1999).

Além de seu uso como praguicidas, os carbamatos também são usados como drogas de eleição na medicina humana para o tratamento da doença de Alzheimer, *miastenia gravis* e glaucoma, e em medicina veterinária como parasiticidas (GUPTA, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de averiguar a segurança clínica e a eficácia pulguicida e carrapaticida, sob condições controladas e conforme as instruções e dosagens fornecidas pelo fabricante, de uma formulação comercial ² à base do organofosforado coumafós para uso em cães.

3.1 Local

O presente estudo foi conduzido nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

3.2 Manutenção e Seleção dos Animais

Foram selecionados 16 cães da raça Beagle, saudáveis ao exame clínico, com idade variando entre 1,5 anos e seis anos, sendo oito machos e oito fêmeas, mantidos no canil experimental do LQEPV. Para ambos os grupos experimentais (controle e tratado) haviam 4 machos e 4 fêmeas. Todos os cães do experimento eram identificados com *transponder* implantado no tecido subcutâneo, entre as escápulas.

Antes de dar início à fase experimental, os cães passaram por um período de adaptação e climatização por 14 dias em baias individuais de alvenaria com piso cimentado (dimensões: 1,5m²), com a limpeza das instalações sendo realizada diariamente.

A água e a alimentação foram fornecidas *ad libitum* por meio de bebedouros e comedouros que eram manejados diariamente. Os animais recebiam água fresca e ração comercial³ contendo 10% de umidade (máx.), 2,9% matéria fibrosa (máx.), 21% de proteína bruta (mín.), 10% de matéria mineral (máx.), 7% de extrato etéreo (mín.), 1,8% de cálcio (mín.) e 0,8% de fósforo (mín.).

Os animais do grupo 1 (controle) não receberam tratamento, enquanto que os animais do grupo 2 foram banhados uma única vez, no dia zero, com o sabonete comercial à base de coumafós.

Na Tabela 2, a seguir, estão indicados o sexo, o peso e a quantidade em gramas do produto administrado de acordo com o peso do animal.

Durante o estudo, a quantidade média de sabonete utilizado foi de 25,795g, com desvio padrão de 0,022g.

3.3 Avaliação da Eficácia

Delineou-se um estudo controlado no qual os animais foram infestados artificialmente com pulgas e carrapatos. Em seguida, eles foram avaliados através da remoção mecânica dos parasitos. Através da comparação do número de parasitos recuperados do grupo controle e tratado, foram calculadas as eficácias.

As infestações aconteceram no dia -7 (antes do tratamento, para efeito de ranqueamento), dia -2 e, posteriormente, dia +5, para avaliação da eficácia.

² Sabonete Asuntol® da Bayer. Fórmula: Cada 100g contém: 1g de coumafós; 100g de excipiente q.s.p.

³ Ração da marca Spike® Carne, Frango e Vegetais para cães adultos da Empresa Farmina.

Após o ranqueamento, procedeu-se o sorteio dos grupos experimentais (controle e tratado) e o remanejamento dos animais para cada grupo.

As infestações foram realizadas colocando-se os parasitos em diferentes regiões do corpo do animal. Para este procedimento os animais tiveram que ser contidos manualmente por 10 minutos.

Cada cão foi infestado com 100 pulgas adultas *Ctenocephalides felis felis* não alimentadas (50 machos e 50 fêmeas) e 50 carrapatos adultos *Rhipicephalus sanguineus* não alimentados (25 machos e 25 fêmeas), oriundos de uma colônia laboratorial mantida nas dependências do LQEPV.

Tabela 2. Quantidade de cães da raça Beagle, sexo, peso e quantidade de sabonete utilizado durante o estudo.

Grupo	Animal	Sexo	Peso (kg)	Quantidade de sabonete utilizado (g)	
Controle	1	M	11,25	-	
	2	M	12,40	-	
	3	M	10,95	-	
	4	M	13,45	-	
	5	F	10,25	-	
	6	F	8,55	-	
	7	F	11,30	-	
	8	F	10,80	-	
	Média				
	Ar.		11,12	-	
DP		1,44	-		
Tratado	9	M	16,30	25,76	
	10	M	10,15	16,98	
	11	M	12,10	21,86	
	12	M	9,50	23,51	
	13	F	12,00	14,49	
	14	F	14,75	28,06	
	15	F	10,30	18,46	
	16	F	11,65	25,40	
	Média				
	Ar.		12,09	25,795	
DP		2,35	0,022		

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão; M: macho; F: fêmea.

Os animais foram inspecionados individualmente. Para cada dia de avaliação, inspecionaram-se os animais quanto à presença de carrapatos vivos e fixados, através do exame manual de toda a superfície corporal e também para a presença de pulgas vivas, com o

auxílio de um pente fino próprio, com aproximadamente 13 dentes por centímetro linear (“comb-test”). Os animais foram então penteados até que não fosse recuperada mais nenhuma pulga.

As pulgas e carrapatos recuperados foram contabilizados e fixados em álcool 70° GL.

No dia 0, os animais foram tratados conforme a recomendação do fabricante. Para esta finalidade os animais foram molhados e ensaboados até que se formasse bastante espuma e toda a pelagem foi friccionada protegendo-se os olhos e as orelhas. Após cinco minutos, eles foram enxaguados. Para melhor efeito, seguindo-se a recomendação do fabricante, os cães foram ensaboados novamente, deixando-os secar com a espuma, impedindo que eles a ingerissem. Após o tratamento, eles foram observados nas tomadas de tempo de 1 hora e 2 horas pós-tratamento e os dados de exame clínico foram registrados em ficha de exame clínico geral.

Para a avaliação da eficácia, foi feita a catação manual para carrapatos e também uso de um pente próprio para retirada das pulgas.

A eficácia pulguicida foi calculada com base na seguinte fórmula: Percentagem de eficácia = (número médio⁴ de pulgas vivas recuperadas no grupo controle – número médio de pulgas vivas recuperadas no grupo medicado) / (número médio de pulgas vivas recuperadas no grupo controle) x 100.

A eficácia carrapaticida foi calculada com base na seguinte fórmula: Percentagem de eficácia = (número médio de carrapatos vivos e fixados recuperados no grupo controle – número médio de carrapatos vivos e fixados no grupo medicado) / (número médio de carrapatos vivos e fixados recuperados no grupo controle) x 100.

3.3.1 Análise estatística

Na análise estatística, os números de pulgas adultas vivas e carrapatos vivos e fixados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Quando se apresentaram normais, os dados eram submetidos ao Teste T. Já os dados que não tiveram distribuição normal foram submetidos ao Teste de Mann-Whitney. O nível de significância a ser considerado foi de 95% ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico computacional livre Bioestat 5.0.

3.4 Avaliação da Segurança Clínica

Esta avaliação baseou-se em duas etapas: exame clínico dos animais e coleta de sangue para exames laboratoriais.

3.4.1 Exame clínico

Os exames clínicos detalhados aconteceram catorze e sete dias antes e no dia do tratamento (Dia 0) com 1 hora e 2 horas de aplicação do produto, e novamente nos dias +1, +3, +7 e +10. Para avaliação do exame clínico foram aferidas: a temperatura retal, a frequência cardíaca (batimentos por minuto), frequência respiratória (número de movimentos respiratórios por minuto), e tempo de preenchimento capilar (em segundos), além da observação das manifestações clínicas, seguindo-se um protocolo pré-estabelecido e parâmetros que constam na ficha de exame clínico em anexo (Anexo A).

As avaliações clínicas foram orientadas por sistema orgânico ou região, contemplando, especialmente, o exame da pele, pêlos, olhos, mucosas, sistema circulatório, respiratório, nervoso, atividade somatomotora e comportamental. Sinais clínicos comuns aos quadros de

⁴ Média aritmética.

intoxicação como tremores, convulsões, dilatação pupilar, sialorréia, diarreia, letargia, apatia e coma foram monitorados.

3.4.2 Exame hematológico e bioquímico

Nos dias experimentais -14 e -7, que precederam o tratamento, e nos dias +1, +2, +7 e +10, após o tratamento, foram coletadas amostras de sangue dos animais para a realização do exame hematológico completo e exame bioquímico.

A via de acesso para a coleta de sangue foi a veia jugular, com o uso de acopladores vacutainer. Foram utilizados tubos contendo anticoagulante EDTA para a realização do hemograma e tubos sem anticoagulante para obtenção de soro e realização do exame bioquímico.

À medida que foram coletadas, as amostras eram encaminhadas ao laboratório para que fossem processadas.

Para avaliação da segurança do produto, foram realizados os seguintes exames hematológicos:

A) Hemograma completo

- Hematimetria: hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de hemácias, permitindo a determinação dos índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM);
- Leucometria: Contagem total de leucócitos e leucometria específica;
- Plaquetometria.

B) Bioquímica sérica

Nos exames bioquímicos foram avaliadas as atividades séricas das enzimas ALT (TGP), AST (TGO), fosfatase alcalina, gama-glutamil-transferase (GGT) e butirilcolinesterase sérica (BuChE), além da concentração sérica de uréia e creatinina.

As avaliações das atividades enzimáticas de ALT, AST, fosfatase alcalina e GGT foram realizadas por cinética mono-reagente, a creatinina e a uréia foram dosadas por reação de tempo fixo mono-reagente e a atividade da colinesterase sérica (butirilcolinesterase) foi feita por cinética bi-reagente. Para todas foi empregado método automatizado.

Para as etapas de hematimetria, leucometria global e plaquetometria, foi utilizado o equipamento pocH 100iV Diff[®] da Sysmex. Para o exame bioquímico foi utilizado o equipamento A15[®] da Biosystems. Os kits de reagentes, com exceção do reagente para a butirilcolinesterase, são todos da Biosystems. O kit para a butirilcolinesterase é do laboratório Labtest. A concentração da proteína plasmática total foi mensurada por refratometria.

Na Tabela 3, a seguir, está representado um resumo das atividades para a execução do estudo com as respectivas datas experimentais e as avaliações correspondentes de cada dia.

Tabela 3. Cronograma de execução e o resumo das etapas da avaliação da segurança e eficácia do produto com as datas de infestação dos cães, coleta de sangue e exame clínico completo.

DIA EXPERIMENTAL	ATIVIDADES
-14	Aclimação e exame clínico detalhado dos animais. Coleta de sangue para exames hematológico e bioquímico
-7	Exame clínico detalhado. Infestação dos animais para efeito de ranqueamento. Coleta de sangue para exames hematológico e bioquímico
-5	Avaliação das infestações através da retirada mecânica dos parasitos. Ranqueamento dos animais
-2	Infestação dos animais
0	Tratamento (banho). Exame clínico detalhado nos tempos de 10 minutos, 1 e 2 horas após o tratamento
+1	Exame clínico detalhado dos animais. Coleta de sangue para exames hematológico e bioquímico
+2	Avaliação das cargas parasitárias dos animais através da retirada mecânica dos parasitos
+3	Exame clínico detalhado. Coleta de sangue para exames hematológico e bioquímico
+5	Nova infestação dos animais
+7	Avaliação das cargas parasitárias dos animais através da retirada mecânica dos parasitos. Exame clínico detalhado. Coleta de sangue para exames hematológico e bioquímico
+10	Exame clínico detalhado. Coleta de sangue para exames hematológico e bioquímico

3.4.3 Análise estatística

Na análise estatística dos valores hematológicos e bioquímicos e alguns parâmetros clínicos, foram analisados quanto a sua distribuição (normal ou não) pelo teste de Shapiro Wilk. Considerou-se que os dados com distribuição normal, o valor deveria ser $>0,05$. Quando a distribuição dos dados observados era normal, o método empregado foi o teste T para duas amostras independentes. Optou-se pela realização do teste não paramétrico de Mann-Whitney para duas amostras independentes, no caso de dados com distribuição anormal. A análise foi efetuada pelo programa estatístico computacional Bioestat 5.0 (Ayres et al., 2007). Foi realizada uma análise estatística pelo teste T para duas amostras relacionadas dentro de cada grupo tratado, ou seja, comparou-se a média de cada parâmetro do dia -14 e -7 com os valores dos dias após o início do tratamento (+1, +3, +7 e +10). Para a análise dos dados os parâmetros foram transformados em Log de 10. O nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Eficácia

Foi detectada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias de pulgas vivas dos grupos controle e tratado para os dias experimentais +2 e +7.

O grupo controle apresentou médias de pulgas vivas de 76,25 e 66,75, respectivamente para os dias +2 e +7 (Tabela 4). Já o grupo tratado apresentou médias de pulgas vivas de 0 e 24,63 respectivamente para os dias +2 e +7 (Tabela 4). O produto em teste apresentou resultados de eficácia pulguicida de 100% e 63,11% respectivamente para os dias +2 e +7 (Tabela 4).

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o produto em teste mostrou-se eficaz na eliminação das pulgas em cães, porém, não apresentou efeito residual de proteção quando os animais foram reinfestados. Este resultado pode ser atribuído a uma característica dos compostos OFs de possuírem meia-vida curta e serem rapidamente eliminados do organismo (FLEMING, 1981; OEHME; MANNALA, 2001; BEUGNET, 2004) pois, embora persistam por um período razoável na pele do animal, seus resíduos duram por pouco tempo nos tecidos (OEHME; MANNALA, 2001; BEUGNET, 2004; TAYLOR; COOP; WALL, 2007), o que faz com que a eficácia do produto abranja apenas um curto período de tempo após a sua administração.

Os resultados, então, comprovam a importância de uma estratégia integrada de controle, uma vez que, se somente 5% da população de pulgas está sobre o hospedeiro e 95% encontram-se no ambiente (LINARDI; GUIMARÃES, 2000), um tratamento ocasional com o produto manteria a infestação sob controle por apenas um curto período de tempo, mas não quebraria todo o ciclo epidemiológico. Como destacado por Carlotti e Jacobs (2000), a presença de ovos, larvas e pupas no ambiente doméstico garantiriam que um animal, mesmo tratado, se tornasse novamente infestado por pulgas.

As médias de carrapatos vivos e fixados dos dois grupos, medicado e controle, para os dias experimentais +2 e +7 foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

O grupo controle apresentou médias de carrapatos vivos e fixados de 32,75 e 31,5, respectivamente para os dias +2 e +7, após o tratamento (Tabela 4). O grupo tratado apresentou médias de carrapatos vivos e fixados de 0,13 e 17,88, respectivamente para os dias +2 e +7 (Tabela 4). O produto em teste apresentou resultados de eficácia carrapaticida de 99,62% e 43,25%, respectivamente para os dias +2 e +7 (Tabela 4). Para o dia experimental +2, a eficácia encontrada neste trabalho foi superior a de outros autores que avaliaram a eficácia carrapaticida do coumafós sobre cepas de *R. sanguineus* (BORGES et al., 2007).

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o produto em teste mostrou-se eficaz na eliminação de carrapatos presentes nos cães, porém, não apresentou efeito residual de proteção contra reinfestações. Tal fato pode ser atribuído às mesmas características farmacológicas que foram associadas em relação à baixa eficácia residual para pulgas, relacionada à sua rápida eliminação (OEHME; MANNALA, 2001; BEUGNET, 2004; TAYLOR; COOP; WALL, 2007).

Tabela 4. Eficácia pulguicida para *Ctenocephalides felis felis* e carrapaticida para *Rhipicephalus sanguineus* do coumafós em formulação comercial para cães.

GRUPO		Número de pulgas vivas recuperadas		Número de carrapatos vivos e fixados recuperados	
		Dia +2	Dia +7	Dia +2	Dia +7
Controle	Média Ar.	76,25	66,75	32,75	31,5
	DP	11,3	13,39	7,1	5,7
Tratado	Média Ar.	0	24,63	0,13	17,88
	DP	0	16,34	0,33	7,72
	Eficácia %	100	63,11	99,62	43,25
	Valor de p	0,0008	0,0046	0,0008	0,0074

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

4.2 Avaliação da Segurança Clínica

Durante todos os dias experimentais (dia 0 ao dia +10), não foram observadas alterações/ manifestações clínicas sugestivas de possíveis reações adversas oriundas do uso do produto nos animais tratados.

Na avaliação clínica completa, os animais foram avaliados seguindo os tópicos presentes em ficha de exame clínico (Anexo B). Durante os dias de avaliação, excepcionalmente no dia 0 (dia da aplicação do produto), os animais foram monitorados por 1h e 2h após a administração do produto no intuito de verificar a ocorrência de intoxicação aguda imediata ao seu uso.

Para cada parâmetro do exame clínico (frequência respiratória, cardíaca e temperatura), os resultados obtidos foram normais para a espécie e sem diferença significativa entre os grupos, conforme evidenciado a seguir em gráficos e Tabelas. Os valores de referência para os parâmetros da avaliação da segurança clínica encontram-se no Quadro 3 no Anexo B.

4.2.1 Frequência respiratória

As médias e os desvios padrões das frequências respiratórias dos cães dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, 0 (1 hora), 0 (2 horas), +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 5. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 30,25; 30,25; 28,75; 30,25; 29,75; 30,50; 29,75; 29,25 e do grupo tratado foram: 29,00; 30,00; 31,00; 27,00; 27,50; 31,00; 28,88; 29,50.

Tabela 5. Médias e desvios padrões das frequências respiratórias (movimentos/ minuto) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS							
		-14	-7	0 (1h)	0 (2h)	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	30,25 ^a	30,25 ^a	28,75 ^a	30,25 ^a	29,75 ^a	30,5 ^a	29,75 ^a	29,25 ^a
	DP	2,25	2,71	2,12	2,92	2,25	2,56	2,49	3,01
Tratado	Média Ar.	29,00 ^{Aa}	30,00 ^{Aa}	31,00 ^{Aa}	27,00 ^{Aa}	27,50 ^{Aa}	31,00 ^{Aa}	28,88 ^{Aa}	29,50 ^{Aa}
	DP	3,21	2,39	3,70	3,70	3,34	2,39	2,47	2,33

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias dos grupos controle e tratado antes e após o início do tratamento ($p > 0,5$).

Quanto aos parâmetros respiratórios, no dia 0 (1 hora), um animal do grupo tratado apresentou valor acima da normalidade (36 mov/min; limites de referência: 18 a 34 mov/min). Todavia, a magnitude do aumento da frequência respiratória foi discreta e não se associou o achado a uma possível intoxicação. Além disso, não foi observada nenhuma alteração associada a outros parâmetros, como a frequência cardíaca, neste animal para este mesmo período, podendo-se atribuir o ocorrido ao estresse do manejo na hora de ser contido sobre a mesa de procedimento. A frequência respiratória normalizou-se no momento seguinte (24 mov/min).

Embora seja descrito na literatura a ocorrência de sintomatologia respiratória devido às intoxicações por OFs por ação deste na musculatura intercostal e diafragma (CAVALIERE et al., 1996; HILMAS; ADLER; BASKIN, 2006), não se observou sinais clínicos de dificuldade respiratória esperados na ocorrência de intoxicação em nenhum cão.

O gráfico abaixo ilustra o comportamento da frequência respiratória dos cães de ambos os grupos controle e tratado durante o período experimental, antes e depois da administração do produto.

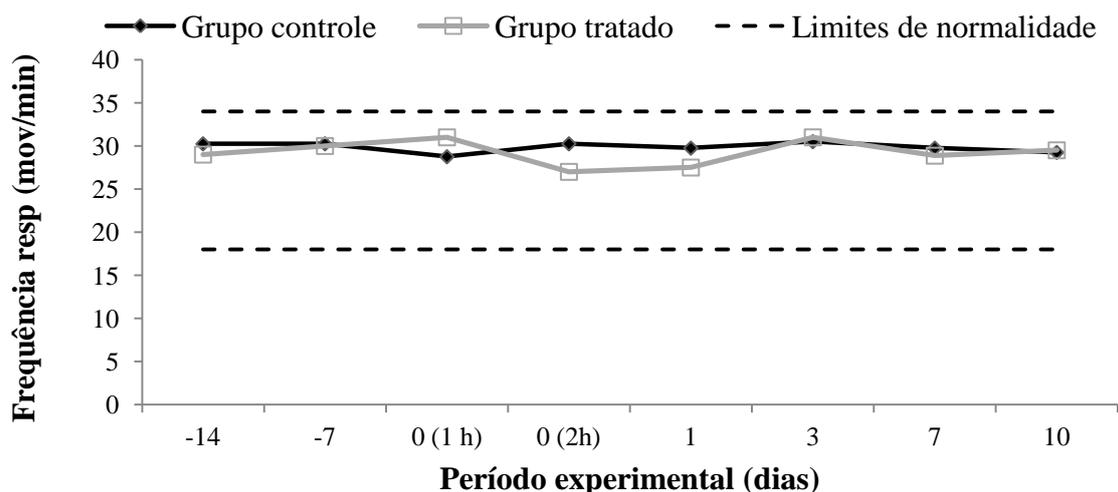


Figura 4. Frequência respiratória (movimentos/ minuto) com limites de normalidade (limite máximo e mínimo), dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

4.2.2 Frequência cardíaca

As médias e os desvios padrões das frequências cardíacas dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, 0 (1 hora), 0 (2 horas), +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 6. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 109; 115,75; 113,75; 114; 107,75; 111; 111; 105,5 e do grupo tratado foram: 110,5; 113,5; 113,25; 119,75; 103,75; 112,5; 101,5.

Tabela 6. Médias e desvios padrões das frequências cardíacas (batimentos/minuto) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS	DIAS EXPERIMENTAIS								
	-14	-7	0 (1h)	0 (2h)	1	3	7	10	
Controle	Média Ar.	109 ^a	115,75 ^a	113,75 ^a	114 ^a	107,75 ^a	111 ^a	111 ^a	105,5 ^a
	DP	12,38	3,92	6,36	6,85	7,59	6,76	5,95	9,43
Tratado	Média Ar.	110,5 ^{Aa}	113,5 ^{Aa}	113,25 ^{Aa}	111,25 ^{Aa}	119,75 ^{Aa}	103,75 ^{Ab}	112,5 ^{Aa}	101,5 ^{Aa}
	DP	9,06	7,54	6,92	7,17	25,08	4,95	7,91	5,93

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, b} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Observou-se diferença significativa entre os resultados dos grupos controle e tratado no dia +3, com diminuição da média do grupo tratado em relação à média do grupo controle, chegando à maior queda de todos os dias de avaliação (103,75 bat/min). Entretanto, as médias não ficaram fora dos limites dos valores de referência, e nenhum animal dentro do grupo para este dia apresentou frequência cardíaca abaixo da normalidade.

Embora Monici (2009) tenha relatado que um dos efeitos tóxicos observados decorrentes da inibição da acetilcolinesterase seja a bradicardia, a redução dos valores dos

animais neste caso, não foi intensa. Portanto, por mais que este resultado nos leve a considerar que o uso do produto, possa ter causado diminuição na frequência cardíaca dos cães, não houve bradicardia acentuada em nenhum dos animais tratados.

Três animais do grupo tratado no dia +1 apresentaram valores acima da normalidade (140, 140 e 156 bat/min), porém, a média para este dia não excedeu o limite superior de referência (intervalo de referência: 70 a 120 bat/min).

Como não foram encontrados na literatura relatos de efeitos adversos dos OFs sobre a frequência cardíaca no sentido de causar aumento desta, conclui-se então a partir deste resultado que um possível estresse, resultante do manejo e da contenção na mesa de procedimento durante a realização da avaliação clínica dos animais, possa ser o responsável por tal alteração, que teve uma variação leve e ocasional. Estes animais inclusive, não demonstraram alterações ao exame clínico ou demais manifestações que sugerissem uma possível intoxicação.

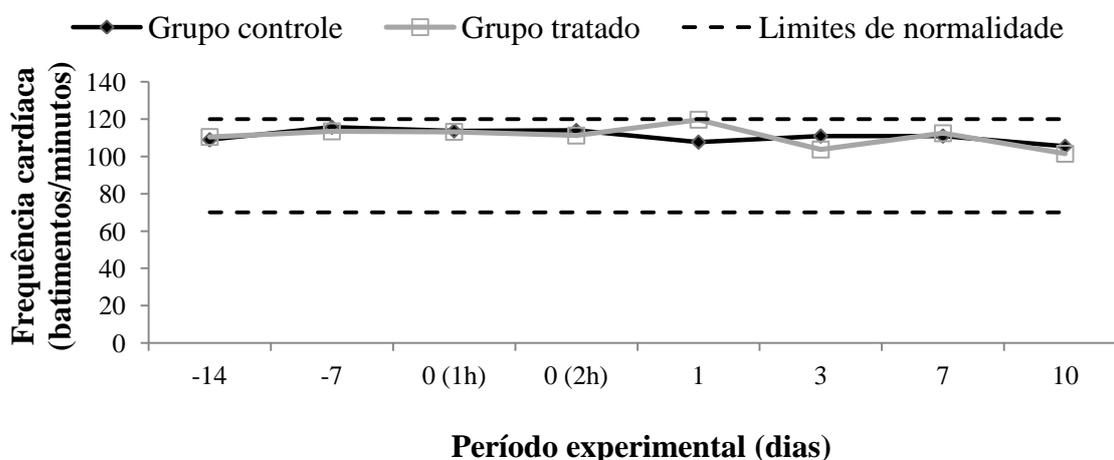


Figura 5. Frequência cardíaca (batimentos/minuto) com valores de referência (limite máximo e mínimo), dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

4.2.3 Temperatura corporal

As médias e os desvios padrões das temperaturas corporais ($^{\circ}$ C) dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, 0 (1 hora), 0 (2 horas), +1, +3, +7 e +10 encontram-se registrados na Tabela 7.

Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 38,90; 38,79; 38,90; 39,06; 38,68; 38,71; 38,65; 38,76 e do grupo tratado foram: 38,83; 38,91; 38,95; 38,89; 38,91; 38,85; 38,68; 38,74.

Considerando-se os limites de referência de 38,4 a 39,4 $^{\circ}$ C para cães, segundo o Manual Merck (2009), dois animais do grupo controle, após o tratamento, apresentaram valores acima da normalidade (39,6 e 39,9 $^{\circ}$ C, para o dia 0 com 1 hora e 2 horas, respectivamente). Este resultado, por se tratar de uma variação discreta e ter acontecido no grupo controle, pode ser atribuído a agitação e contenção durante a avaliação clínica.

Enquanto que, no dia +1, um animal apresentou valor abaixo da normalidade (38,2 $^{\circ}$ C) e no dia +7, três animais apresentaram valores abaixo do limite inferior (38,1; 38,2 e 38,2 $^{\circ}$ C). Porém, como a alteração foi observada apenas no grupo que não recebeu tratamento, não há nenhuma relação entre a ocorrência de tal alteração com o uso do coumafós. Assim, tais achados podem ter ocorrido devido a uma variação individual dos animais em questão. Além disso, vale ressaltar que a redução abaixo do limite de referência para estes animais não foi muito intensa.

No grupo tratado, todos os animais se apresentaram dentro dos valores de normalidade e não houve diferença significativa na comparação pré e pós-tratamento, nem com o grupo controle.

Tabela 7. Médias e desvios padrões das temperaturas (°C) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS							
		-14	-7	0 (1h)	0 (2h)	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	38,90 ^a	38,79 ^a	38,90 ^a	39,06 ^a	38,68 ^a	38,71 ^a	38,65 ^a	38,76 ^a
	DP	0,35	0,31	0,45	0,45	0,42	0,26	0,51	0,27
Tratado	Média Ar.	38,83 ^{Aa}	38,91 ^{Aa}	38,95 ^{Aa}	38,89 ^{Aa}	38,91 ^{Aa}	38,85 ^{Aa}	38,68 ^{Aa}	38,74 ^{Aa}
	DP	0,24	0,33	0,36	0,30	0,39	0,37	0,32	0,32

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

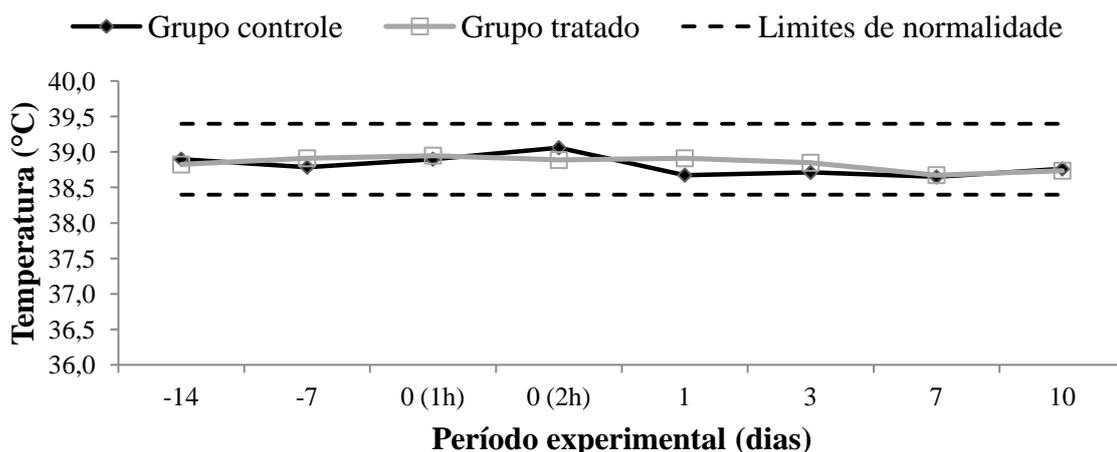


Figura 6. Temperatura, (em °C) com valores de referência (limite máximo e mínimo), dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

4.2.4 Exame hematológico

Todas as medições do exame hematológico (exceto leucometria específica) foram realizadas em aparelho automatizado de acordo com o princípio de impedância (ou tecnologia de Coulter) no qual as células foram avaliadas em relação ao tamanho e a contagem celular.

Em relação ao eritrograma (hematimetria, dosagem de hemoglobina e hematócrito) e à avaliação dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) não se observou diferença estatística significativa entre os grupos controle e tratado.

As médias e os desvios padrões das contagens de hemácias (He) dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 8. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 6,36; 6,31; 6,03; 6,25; 6,17; 6,55 e do grupo tratado foram: 6,17; 6,38; 6,41; 6,19; 6,15; 6,20.

Tabela 8. Médias e desvios padrões das contagens de hemácias (cél/μL) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	6,36 ^a	6,31 ^a	6,03 ^a	6,25 ^a	6,17 ^a	6,55 ^a
	DP	0,65	0,64	0,63	0,51	0,32	0,52
Tratado	Média Ar.	6,17 ^{Aa}	6,38 ^{Aa}	6,41 ^{Aa}	6,19 ^{Aa}	6,15 ^{Aa}	6,20 ^{Aa}
	DP	0,58	0,35	0,54	0,33	0,34	0,35

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

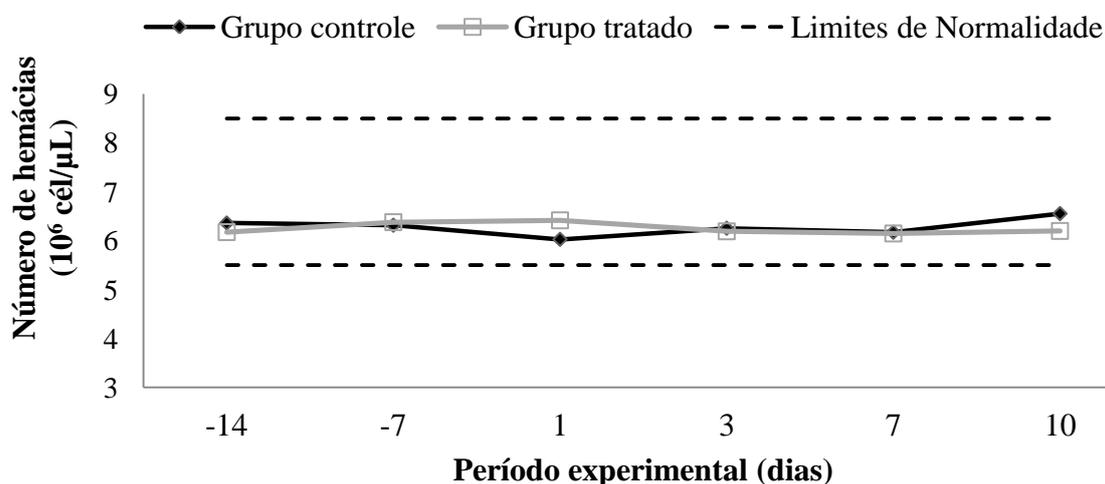


Figura 7. Número de hemácias (10^6 cél/μL) com limites de normalidade (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

A concentração de hemácias é obtida pela contagem de partículas de hemácias em amostra de sangue diluído em solução isotônica. Geralmente, o resultado se assemelha ao do hematócrito e ao da concentração da hemoglobina, e o hematócrito é o parâmetro preferido para avaliação da massa eritrocitária. A partir da contagem de hemácias, o equipamento calcula o hematócrito (THRALL et al., 2007).

Durante o presente estudo, apenas um animal do grupo controle, no dia +1, apresentou valor abaixo da normalidade quanto à contagem de hemácias ($5,37$ cél/μL) após o tratamento. Porém, como a alteração foi observada apenas em um animal e no grupo que não recebeu tratamento, não se relacionou esta ocorrência ao uso do produto. Este resultado pode ser decorrente de uma pequena oscilação momentânea no número de eritrócitos circulantes deste animal, pois suas contagens posteriores mostraram-se novamente normalizadas nos demais dias experimentais. Além disso, a queda apresentada nesta data foi muito próxima do limite inferior de normalidade (limites de referência: $5,5$ a $8,5$ 10^6 cél/μL).

É importante considerar também que, leves oscilações, esporádicas, com decréscimos momentâneos abaixo do limite inferior de normalidade, ou muito próximo a este, podem ser

explicadas por variações individuais dos animais, uma vez que, se encontravam fisiologicamente normais embora margeassem o limite inferior de normalidade. Assim, aleatoriamente, suas contagens de células decresciaam e os tornavam temporariamente anêmicos, mas ainda estavam clinicamente saudáveis.

No grupo tratado, todos os animais apresentaram contagens de hemácias dentro dos valores de normalidade. A análise estatística realizada comparando-se os resultados pré-tratamento com cada tempo após o tratamento demonstrou que não ocorreu variação significativa entre as mesmas, além de não ter havido diferença significativa entre os grupos controle e tratado em nenhum momento.

As médias e os desvios padrões dos valores de hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht) dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Para a hemoglobina as médias do grupo controle, respectivamente para esses dias experimentais foram: 13,13; 12,74; 12,39; 13,56; 12,70; 13,65 e, do grupo tratado foram: 12,63; 12,93; 13,01; 13,33; 12,63; 12,99.

Para os valores de hematócrito as médias dos animais do grupo controle foram respectivamente: 40,56; 39,56; 38,90; 41,18; 38,71; 41,68 e do grupo tratado: 39,55; 40,06; 40,39; 40,04; 38,64; 39,91.

Tabela 9. Médias e desvios padrões dos valores de hemoglobina (g/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar	13,13 ^a	12,74 ^a	12,39 ^a	13,56 ^a	12,70 ^a	13,65 ^a
	DP	1,24	1,22	1,09	0,74	0,71	1,04
Tratado	Média Ar	12,63 ^{Aa}	12,93 ^{Aa}	13,01 ^{Aa}	13,33 ^{Aa}	12,63 ^{Aa}	12,99 ^{Aa}
	DP	1,25	0,70	0,95	0,90	0,68	0,51

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 10. Médias e desvios padrões dos valores de hematócrito (%) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar	40,56 ^a	39,56 ^a	38,90 ^a	41,18 ^a	38,71 ^a	41,68 ^a
	DP	3,94	3,37	2,96	2,32	1,81	2,73
Tratado	Média Ar	39,55 ^{Aa}	40,06 ^{Aa}	40,39 ^{Aa}	40,04 ^{Aa}	38,64 ^{Aa}	39,91 ^{Aa}
	DP	3,51	1,98	2,88	2,21	2,01	1,90

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

A análise estatística realizada dentro de cada grupo tratado, comparando-se o período pré-tratamento com cada tempo após o tratamento, para ambos os parâmetros, concentração de hemoglobina e hematócrito, não diferiram significativamente.

Em relação à hemoglobina, um animal do grupo controle apresentou concentração inferior ao limite de normalidade (11,1 g/dL; intervalo de referência 12,0 a 18,0 g/dL) no dia -14, tendo se mantido abaixo também em mais dois dias de avaliação: -7 e +1 (11,6 e 11,8 g/dL). Mais outros três animais, ainda no grupo controle apresentaram valores abaixo da normalidade durante o estudo: animal 1: 11,4 e 11,2, nos dias -7 e +1; animal 2: 11,6 no dia +1; e animal 7: 11,3 e 11,4 nos dias -7 e +7.

No grupo tratado, um animal apresentou valores abaixo da normalidade (11,2; 11,3; 11,9 e 11,4 g/dL) nos dias -14, -7, +1 e +7, respectivamente e mais outros três também apresentaram, em momentos distintos e isolados, valores decrescidos para hemoglobina (11,7 e 11,8 no dia -14 e 11,9 no dia +3).

Tal como discutido anteriormente para a contagem de hemácias, o decréscimo na concentração de hemoglobina nesses animais pode ser atribuído a oscilações individuais. Isso acaba por levá-los a apresentar, algumas vezes, resultados hematimétricos muito próximos dos limites inferiores de normalidade, com leves oscilações ocasionais além desses limites, mas que, na verdade, estão sempre clinicamente saudáveis.

Além disso, é importante salientar que a redução nos valores observados não possui grande relevância na avaliação do estudo, visto que, a queda não foi acentuada.

Em relação ao hematócrito, também foram observados decréscimos aleatórios em alguns animais, tanto no grupo controle quanto no tratado.

No grupo controle, três animais apresentaram valores abaixo da normalidade (animal 1: 35,7 no dia -7; animal 5: 34,1 e 35,8 dias -14 e -7; e animal 7: 36,2 e 35,3%, respectivamente nos dias -7 e +7).

Enquanto que no grupo tratado, um animal apresentou, em quase todos os dias experimentais, (com exceção do dia +10) valores abaixo da normalidade (34,7; 35,5; 36,9; 36,9; 35,3%, para os dias -14, -7, +1, +3 e +7. Além deste, apenas mais um animal apresentou valor abaixo do limite inferior (36,9 no dia +1).

Uma vez que os três parâmetros que avaliam a hematimetria (contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito) estejam intimamente relacionados, é de se esperar que, havendo uma redução em um deles, há uma grande probabilidade de haver

redução em outro, embora isso não necessariamente vá ocorrer em 100% dos casos, principalmente se as oscilações forem leves.

Porém, no caso mencionado acima, onde houve redução da hemoglobina em quatro momentos de avaliação para o mesmo animal, que também apresentou hematócrito abaixo da normalidade em quase todos os dias experimentais, estes resultados podem ser enquadrados nesta situação e podem ser justificados devido a uma discreta anemia transitória observada nos cães.

Vale ressaltar ainda que, mesmo nesta situação em que houve decréscimo dos parâmetros avaliados repetidas vezes durante o estudo, não se deve atribuir tal achado ao tratamento com coumafós, pois os resultados não possuíam comportamentos gradualmente tendenciosos, que indicassem a possibilidade de um aumento ou decréscimo do parâmetro analisado ao longo do tempo, o que nos leva a concluir que tais achados são excepcionais e aleatórios.

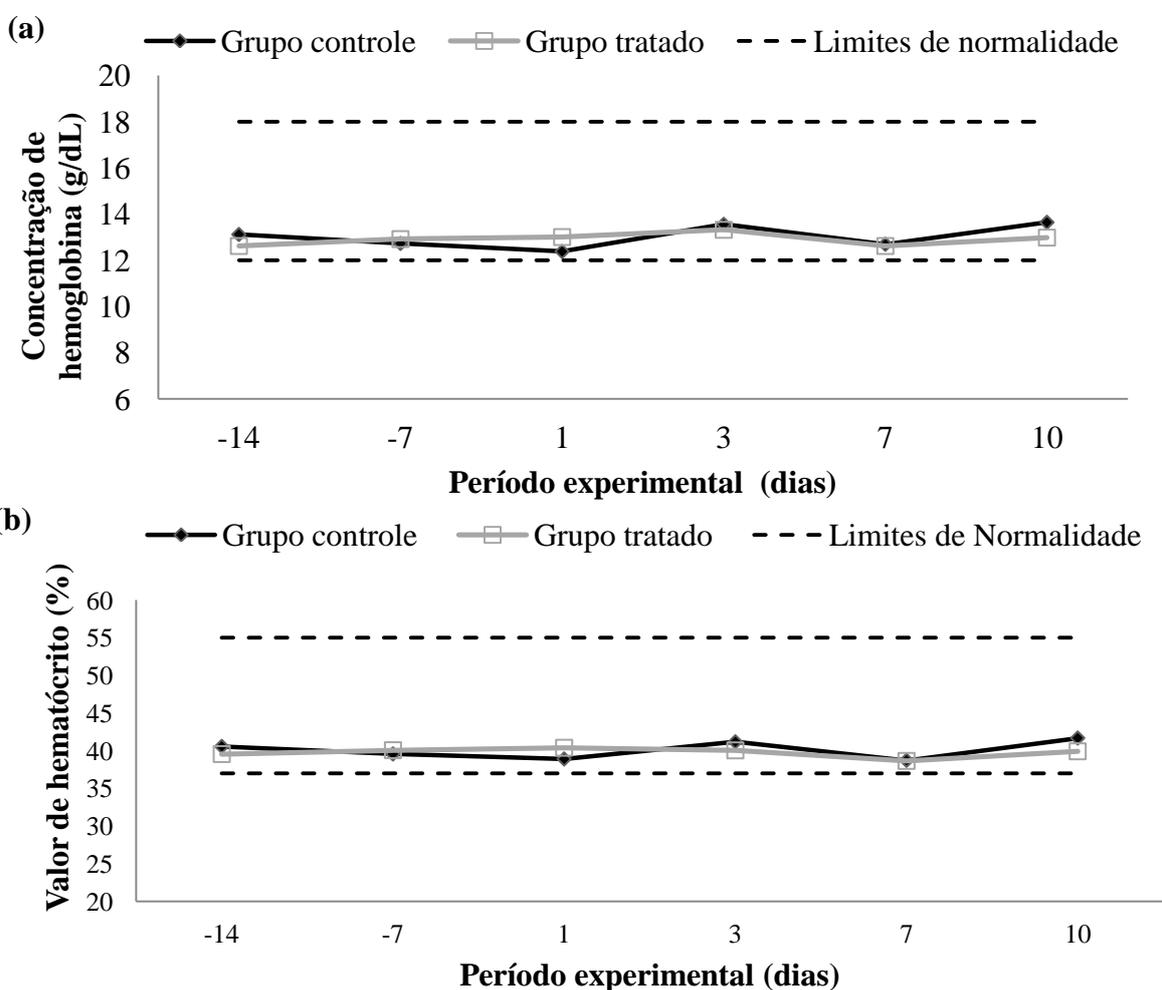


Figura 8. Valor de hemoglobina (g/dL) (a) e hematócrito (%) (b) respectivamente, com limites de normalidade (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

As médias e os desvios padrões dos valores dos índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 encontram-se nas Tabelas 11, 12 e 13 respectivamente.

Respectivamente para esses dias experimentais, as médias dos valores de VCM do grupo controle foram: 63,84; 62,76; 64,70; 65,99; 62,78; 63,71 e do grupo tratado foram: 64,14; 62,86; 63,06; 64,71; 62,93; 64,50.

O índice VCM aumentado indica aumento no número de hemácias grandes na circulação (macrócitos), podendo haver reticulocitose (COWELL, 2004), indicando resposta medular, estar relacionado à idade ou macrocitose hereditária. Enquanto que, uma queda no índice, refletindo uma microcitose (abaixo do limite inferior de referência), indicaria principalmente anemia ferropriva (BUSH, 2004; COWELL, 2004).

Todos os animais apresentaram valores dentro da normalidade. A análise estatística realizada no grupo tratado comparando-se o período pré-tratamento com cada tempo após o tratamento demonstrou que não ocorreu diferença significativa entre as mesmas. Também não foram verificadas diferenças significativas entre as médias dos grupos controle e tratado antes e após o início do tratamento para este parâmetro.

Tabela 11. Médias e desvios padrões dos valores de volume corpuscular médio (VCM) (fL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	63,84 ^a	62,76 ^a	64,70 ^a	65,99 ^a	62,78 ^a	63,71 ^a
	DP	1,63	1,39	2,74	1,90	1,71	2,19
Tratado	Média Ar.	64,14 ^{Aa}	62,86 ^{Aa}	63,06 ^{Aa}	64,71 ^{Aa}	62,93 ^{Aa}	64,50 ^{Aa}
	DP	2,23	0,89	1,66	1,35	1,47	2,94

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

As médias dos valores de HCM dos animais do grupo controle foram: 20,65; 20,19; 20,60; 21,74; 20,58; 20,88 e do grupo tratado foram: 20,46; 20,28; 20,30; 21,54; 20,55; 21,00. Todos os animais apresentaram valores dentro da normalidade para este parâmetro.

A hemoglobina corpuscular média é um índice raramente utilizado. Também indica a quantidade de hemoglobina nas hemácias, mas é menos precisa do que a CHCM, pois é calculada a partir de duas medidas menos precisas: contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina. Há pouca vantagem em seu relato ou aplicação, exceto que, geralmente, varia na proporção do VCM e qualquer alteração desproporcional na HCM sugere erro na contagem de hemácias ou na determinação da hemoglobina (BUSH, 2004).

Nesta pesquisa, não foram verificadas diferenças significativas entre as médias dos grupos controle e tratado antes e após o início do tratamento para HCM. Porém, a análise estatística realizada no grupo tratado comparando-se os resultados pré-tratamento com cada tempo pós-tratamento demonstrou que ocorreu diferença entre o dia +3 e os demais dias experimentais, decorrente de um discreto aumento na média para este dia em comparação aos dias pré-tratamento.

Todavia, este achado não é compatível com possíveis reações adversas que podem ser observadas mediante o uso do produto. Tal achado deve ser atribuído a uma oscilação

ocasional e não ao tratamento, pois, na comparação com o grupo controle, eles não diferiram significativamente nesta data.

Tabela 12. Médias e desvios padrões dos valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	20,65 ^a	20,19 ^a	20,60 ^a	21,74 ^a	20,58 ^a	20,88 ^a
	DP	0,69	0,33	0,46	0,93	0,47	0,92
Tratado	Média Ar.	20,46 ^{Aa}	20,28 ^{Aa}	20,30 ^{Aa}	21,54 ^{Ba}	20,55 ^{Aa}	21,00 ^{Aa}
	DP	0,49	0,20	0,37	1,11	0,46	1,02

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, B} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

As médias dos valores de CHCM dos animais no grupo controle foram: 32,38; 32,18; 31,86; 32,95; 32,80; 32,74 e no grupo tratado foram: 31,90; 32,25; 32,21; 33,26; 32,70; 32,56.

Tabela 13. Médias e desvios padrões dos valores de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	32,38 ^a	32,18 ^a	31,86 ^a	32,95 ^a	32,80 ^a	32,74 ^a
	DP	0,44	0,63	0,91	0,69	0,75	0,78
Tratado	Média Ar.	31,90 ^{Aa}	32,25 ^{Aa}	32,21 ^{Aa}	33,26 ^{Ba}	32,70 ^{Ba}	32,56 ^{Aa}
	DP	0,62	0,48	0,43	1,19	0,44	1,01

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, B} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

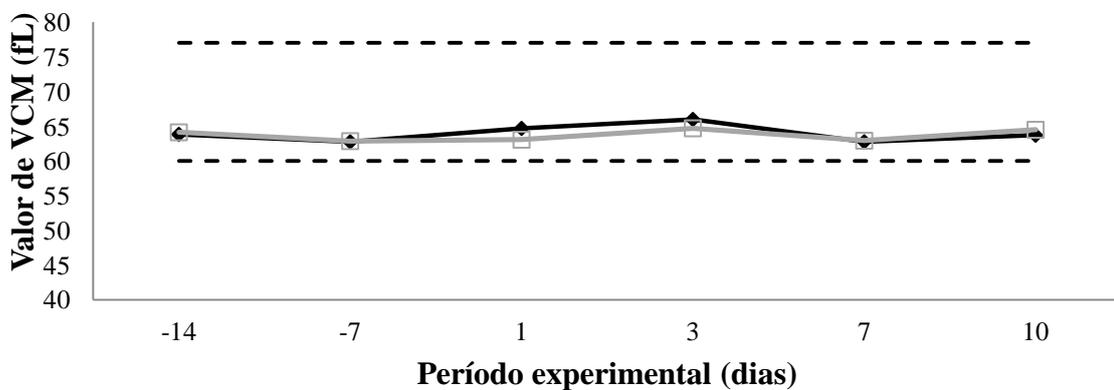
Não foram verificadas diferenças significativas entre as médias dos grupos controle e tratado para CHCM. Contudo, alguns animais em ambos os grupos, em todos os dias experimentais, apresentaram valores abaixo da normalidade antes e após o tratamento. Entretanto, as médias para todos os dias experimentais se mantiveram dentro da normalidade.

Em suma, tais achados podem ser explicados da seguinte maneira: por se tratar de um parâmetro matemático calculado com base na concentração de hemoglobina e hematócrito, uma vez que estes parâmetros tenham se mostrado alterados, conseqüentemente, a CHCM também será alterada e sua justificativa será pela mesma causa que da queda destes dois anteriores, atribuindo-os a variações ocasionais individuais dos cães.

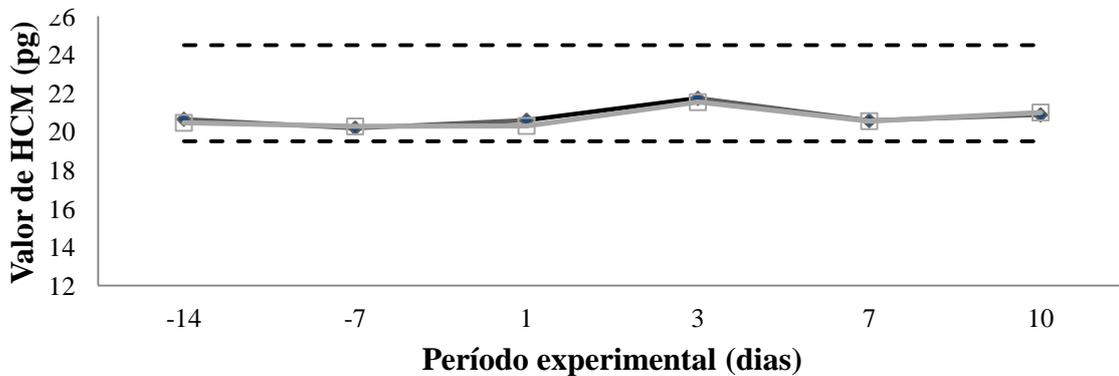
Aumentos absolutos no CHCM, ou aumentos absolutos da hemoglobina no eritrócito, não são observados e são frequentemente artefatuais. Hemólise intravascular ou *in vitro* seriam as causas mais comuns que levariam a este tipo de resultado. Como causas de diminuição do índice, tem-se, principalmente, a reticulocitose e a deficiência de ferro (COWELL, 2004).

A análise estatística realizada no grupo tratado, comparando-se a média pré-tratamento com a média de cada tempo após o tratamento demonstrou ter ocorrido diferença entre a média dos dias +3 e +7 e os demais dias experimentais. Todavia, este achado também não é compatível com possíveis reações adversas que podem ser observadas mediante o uso do produto e tal achado deve ser atribuído a uma oscilação momentânea e não ao tratamento, pois, na comparação com o grupo controle, eles não diferiram significativamente nesta data.

(a) —◆— Grupo controle —□— Grupo tratado - - - Limites de normalidade



(b) —◆— Grupo controle —□— Grupo tratado - - - Limites de normalidade



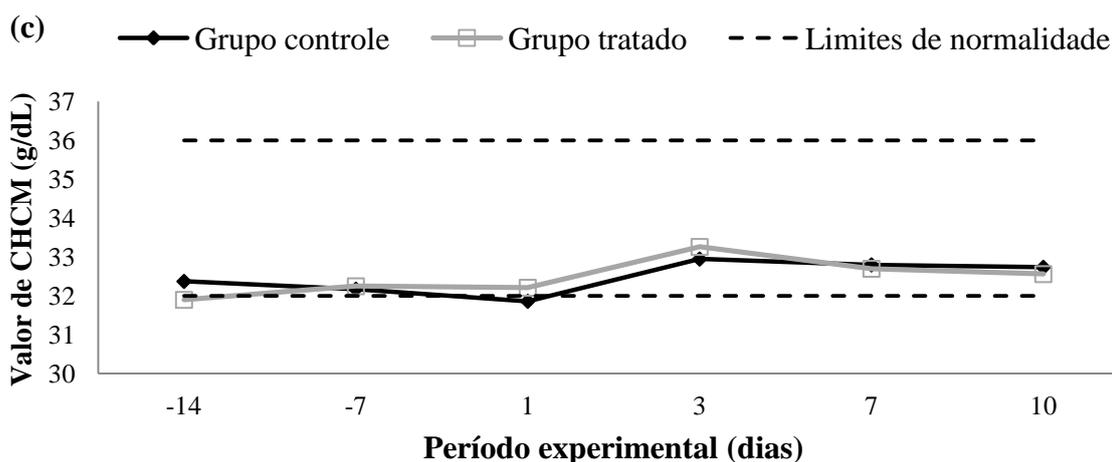


Figura 9. Valor de volume corpuscular médio (VCM) (fL) (a), hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) (b) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) (c) respectivamente, com limites de normalidade (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

As médias e os desvios padrões das contagens de leucócitos totais dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 14. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 8975,00; 9737,50; 8762,50; 10475,00; 7612,50; 8200,00 e do grupo tratado foram: 8887,50; 9187,50; 8262,50; 10262,50; 8450,00; 8062,50.

Alterações na leucometria global são denominadas leucocitose ou leucopenia, onde ocorrem, respectivamente, aumento e diminuição na contagem de leucócitos. Tanto na leucocitose, quanto na leucopenia, é imprescindível observar as alterações quantitativas que ocorrem em cada tipo de leucócito, uma vez que, as interpretações consistem na junção dos dois dados (ROCCO, 2009).

Dentre as causas de leucocitose patológica, têm-se a ocorrência de infecções generalizadas ou localizadas, além de outros processos inflamatórios, de um modo geral, e também de doenças autoimunes e leucemias leucêmicas (ROCCO, 2009).

No caso da leucopenia, esta pode ser balanceada ou restrita a apenas um tipo leucocitário. Embora quase sempre indique processo patológico, representando um prognóstico desfavorável (ROCCO, 2009), não havendo diminuição em nenhum dos tipos celulares em particular, não se deve correlacionar o achado à causa patológica para a ocorrência da queda na contagem global de leucócitos.

No presente estudo, não foram verificadas diferenças significativas entre as médias dos grupos controle e tratado e também ao comparar-se os períodos pré-tratamento com cada momento pós-tratamento.

Dois animais do grupo controle apresentaram valores abaixo da normalidade (5900, no dia +1; 5500, no dia +10). No entanto, como a alteração foi observada apenas no grupo controle, não há relação com o uso do produto. Além disso, não se observou na contagem específica de leucócitos uma redução no número de neutrófilos – células estas que estão em maior proporção no sangue e poderiam levar a uma leucopenia caso estivessem decrescidas. Sendo assim, a queda na leucometria global não deve ser relacionada à ocorrência de nenhuma enfermidade, sendo sua ocorrência sem importância patológica.

No grupo tratado, todos os animais apresentaram leucometria global dentro dos limites de normalidade.

Também não se observou diferença estatística na contagem diferencial de leucócitos para algumas células, em especial para basófilos, mielócitos, metamielócitos e bastões, cujas

contagens tiveram valores nulos em todos os dias experimentais, mantendo-se dentro da normalidade.

Tabela 14. Médias e desvios padrões das contagens de leucócitos totais (cél/ μ L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS	DIAS EXPERIMENTAIS						
	-14	-7	1	3	7	10	
Controle	Média Ar.	8975,00 ^a	9737,50 ^a	8762,50 ^a	10475,00 ^a	7612,50 ^a	8200,00 ^a
	DP	2343,84	2461,67	1834,54	745,94	1011,98	1804,76
Tratado	Média Ar.	8887,50 ^{Aa}	9187,50 ^{Aa}	8262,50 ^{Aa}	10262,50 ^{Aa}	8450,00 ^{Aa}	8062,50 ^{Aa}
	DP	2655,15	1761,04	1492,78	962,05	1400,00	1659,55

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

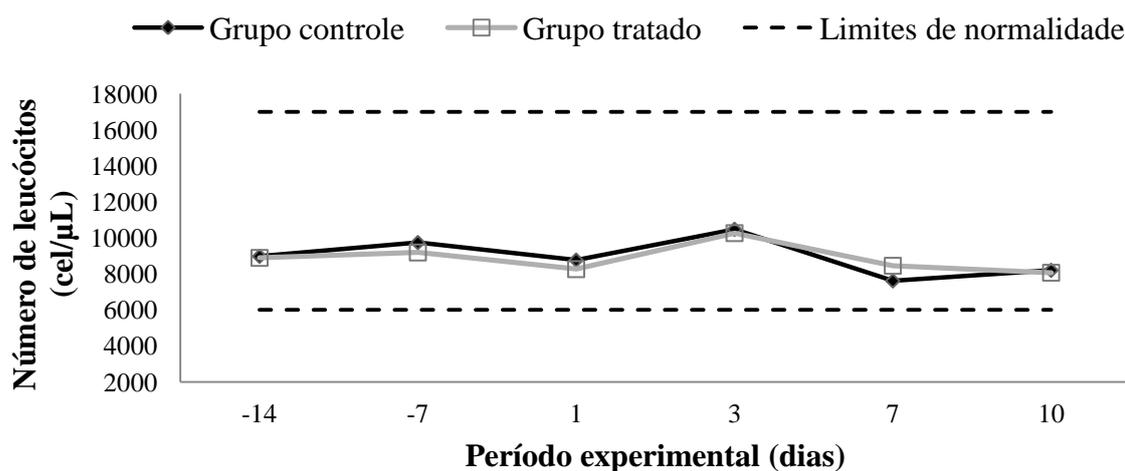


Figura 10. Número de leucócitos (cel/ μ L) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

As médias e os desvios padrões das contagens de segmentados dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 encontram-se na Tabela 15.

Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 6548,00; 6867,75; 6373,13; 8133,63; 5524,75; 5937,88 e do grupo tratado foram: 6410,25; 6492,25; 5775,50; 7384,63; 5977,63; 5585,38.

Alterações quantitativas e qualitativas em um tipo particular de leucócito podem refletir a natureza do processo e a resposta do organismo a ele. Os neutrófilos (também chamados de segmentados) são os leucócitos presentes em maior porcentagem no sangue dos animais, portanto, a maioria das leucocitoses estão associadas à neutrofilia (ROCCO, 2009). Eles funcionam primariamente como fagócitos e são particularmente importantes em quadros infecciosos e na inflamação (KERR, 2003). Contudo, as causas de neutrofilia ainda podem ser variadas, mas destacam-se, em linhas gerais: causas inflamatórias (especialmente, infecções agudas bacterianas); glicocorticoides (endógenos ou exógenos); adrenalina e distúrbios

mieloproliferativos. Já a neutropenia (diminuição no número de neutrófilos) pode ter como causa um aumento da demanda tecidual por neutrófilos ou produção diminuída graças a ação de drogas, toxinas, neoplasias ou substâncias químicas (BUSH, 2004).

Tabela 15. Médias e desvios padrões das contagens de segmentados (célis/ μ L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	6548,00 ^a	6867,75 ^a	6373,13 ^a	8133,63 ^a	5524,75 ^a	5937,88 ^a
	DP	1853,64	1840,80	1377,05	861,45	878,24	1427,54
Tratado	Média Ar.	6410,25 ^{Aa}	6492,25 ^{Aa}	5775,50 ^{Aa}	7384,63 ^{Aa}	5977,63 ^{Aa}	5585,38 ^{Aa}
	DP	1962,76	1364,23	1086,71	805,01	983,36	1068,78

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Não foram verificadas diferenças significativas entre as médias dos grupos controle e tratado antes e após o tratamento. Todos os animais apresentaram valores dentro da normalidade. A análise estatística demonstrou que não ocorreu diferença significativa no grupo tratado comparando-se a média pré-tratamento com a média de cada tempo após o tratamento.

As médias e os desvios padrões das contagens de linfócitos dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 encontram-se na Tabela 16.

Respectivamente para esses dias experimentais, as médias de linfócitos do grupo controle foram: 1735,75; 1995,38; 1575,88; 1807,88; 1493,63; 1658,13 e do grupo tratado foram: 1775,00; 1809,25; 1659,25; 2101,50; 1793,50; 1827,25.

A maioria dos linfócitos (mais de 95%) é T ou B; os restantes são designados como células nulas, cujas funções não estão estabelecidas (podem representar precursores de outras células). Os diferentes tipos de linfócitos (T e B) não podem ser distinguidos pela sua aparência no esfregaço sanguíneo e o número de linfócitos no sangue depende da quantidade que entra e da quantidade que sai; uma vez que a produção de linfócitos diminuída usualmente resulta em linfopenia, a produção aumentada pode não resultar em linfocitose – deve haver uma perda significativa nos tecidos (BUSH, 2004).

A linfocitose é relativamente rara no cão e não causa aumento significativo na contagem total de leucócitos, embora valores totais de leucócitos possam estar na parte superior da faixa normal. Já a linfopenia é um achado relativamente comum em animais doentes (principalmente na ocorrência de infecções virais, bacterianas maciças, neoplasias, falhas renais crônicas, dentre outras causas) (BUSH, 2004).

Tabela 16. Médias e desvios padrões das contagens de linfócitos (cél/s/μL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	1735,75 ^a	1995,38 ^a	1575,88 ^a	1807,88 ^a	1493,63 ^a	1658,13 ^a
	DP	342,85	489,11	337,31	325,95	176,10	267,90
Tratado	Média Ar.	1775,00 ^{Aa}	1809,25 ^{Aa}	1659,25 ^{Aa}	2101,50 ^{Bb}	1793,50 ^{Ab}	1827,25 ^{Aa}
	DP	663,20	340,99	253,33	116,48	326,60	542,58

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, Bb} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Foram verificadas diferenças significativas para os resultados do grupo tratado após o tratamento, mas que não diferiram do controle no dia +3 e +7 após o tratamento. Porém, todos os animais se apresentaram dentro dos limites de normalidade. No dia +3 houve aumento da média em relação ao período pré-tratamento e ao grupo controle, enquanto que, no dia +7 houve aumento da média em comparação apenas com o grupo controle. Embora esta variação tenha sido observada no grupo tratado, não se atribuiu esta ocorrência a um possível efeito do tratamento, pois a oscilação na contagem de linfócitos foi sutil e ocorreu em momentos pontuais. Os animais, em outros momentos de avaliação, apresentavam-se hora aumentando, hora diminuindo, com um padrão de contagem irregular, que se manteve assim durante todo o estudo. Logo, atribuiu-se esse aumento discreto da média neste dia a um efeito do acaso e sem relação ao tratamento.

As médias e os desvios padrões das contagens de monócitos dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 17. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 455,13; 466,63; 546,13; 299,50; 323,38; 365,13 e do grupo tratado foram: 495,00; 489,38; 486,63; 476,63; 437,38; 337,13.

As células do sistema mononuclear fagocitário (grupo ao qual pertencem os monócitos e os macrófagos teciduais) têm um grande número de funções, como: fagocitar e destruir microorganismos, especialmente bactérias intracelulares, além de fagocitar material estranho, detritos celulares e células mortas, danificadas e não funcionais. Usualmente, os monócitos são referidos também na ocorrência de doenças crônicas (BUSH, 2004).

Tabela 17. Médias e desvios padrões das contagens de monócitos (célis/ μ L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	455,13 ^a	466,63 ^a	546,13 ^a	299,50 ^a	323,38 ^a	365,13 ^a
	DP	116,42	150,84	189,17	80,01	117,33	100,28
Tratado	Média Ar.	495,00 ^{Aa}	489,38 ^{Aa}	486,63 ^{Aa}	476,63 ^{Ab}	437,38 ^{Aa}	337,13 ^{Aa}
	DP	248,59	147,62	148,25	122,15	175,41	88,80

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, b} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Verificaram-se diferenças significativas quanto ao momento de avaliação do dia +3 entre o grupo controle e tratado, porém, sem diferir estatisticamente dentro do grupo tratado na comparação entre os períodos antes e pós-tratamento. Além disso, nenhum animal apresentou valores fora dos limites de normalidade em nenhum dos grupos, para nenhum momento do estudo. Tal como foi observado para linfócitos, a variação na contagem de monócitos também não deve ser atribuída a um possível efeito do tratamento, visto que, ao analisar as contagens dos dias anteriores e posteriores, o comportamento dos dados é inconstante e as oscilações são aleatórias.

As principais funções dos eosinófilos são reduzir a inflamação e limitar sua expansão, regular respostas alérgicas e controlar infecções parasitárias. Números crescentes de eosinófilos são associados com dano tecidual crônico, envolvendo especialmente reações alérgicas (parasitismo, em particular). Enquanto que, números decrescentes são associados a efeitos de glicocorticoides, tanto endógenos, quanto exógenos (administrados) (BUSH, 2004).

As médias e os desvios padrões das contagens de eosinófilos dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 18. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias das contagens de eosinófilos do grupo controle foram: 236,13; 407,75; 267,38; 234,00; 270,75; 238,88 e do grupo tratado foram: 207,25; 396,63; 341,13; 299,75; 241,50; 312,75.

Tabela 18. Médias e desvios padrões das contagens de eosinófilos (cél/μL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS	DIAS EXPERIMENTAIS						
	-14	-7	1	3	7	10	
Controle	Média Ar.	236,13 ^a	407,75 ^a	267,38 ^a	234,00 ^a	270,75 ^a	238,88 ^a
	DP	91,41	124,11	113,88	102,21	67,37	99,68
Tratado	Média Ar.	207,25 ^{Aa}	396,63 ^{Aa}	341,13 ^{Aa}	299,75 ^{Aa}	241,50 ^{Aa}	312,75 ^{Aa}
	DP	93,27	113,90	150,77	107,63	73,81	115,38

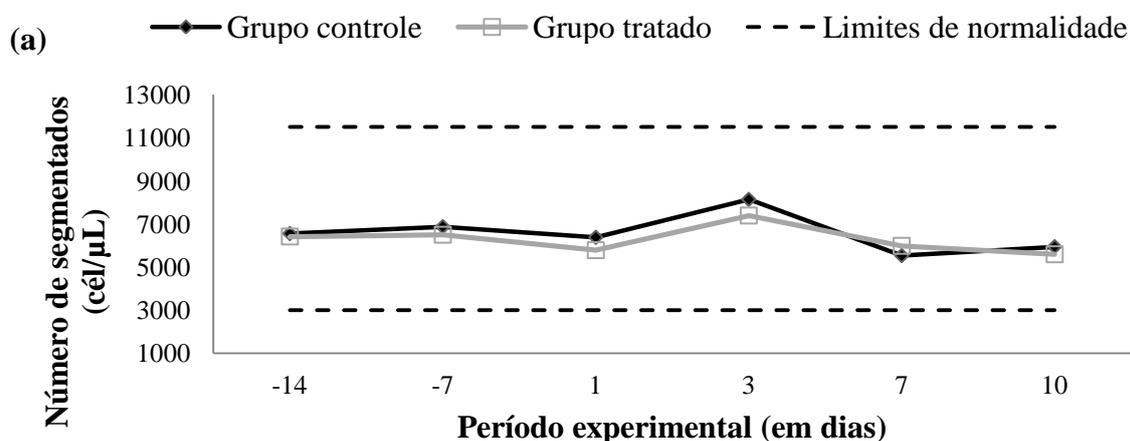
Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e tratado antes e após o tratamento.

Apenas um animal do grupo controle apresentou valor abaixo da normalidade no dia +3 (95 células/μL; intervalo de referência: 100 a 750 células/μL). Entretanto, por se tratar de um animal do grupo controle, não há nenhuma relação com o produto testado, podendo ser associada nesse caso a um estresse do manejo, particular deste animal.

A análise estatística realizada no grupo tratado comparando-se os resultados pré-tratamento com cada tempo pós-tratamento demonstrou que não ocorreu diferença significativa entre as mesmas.



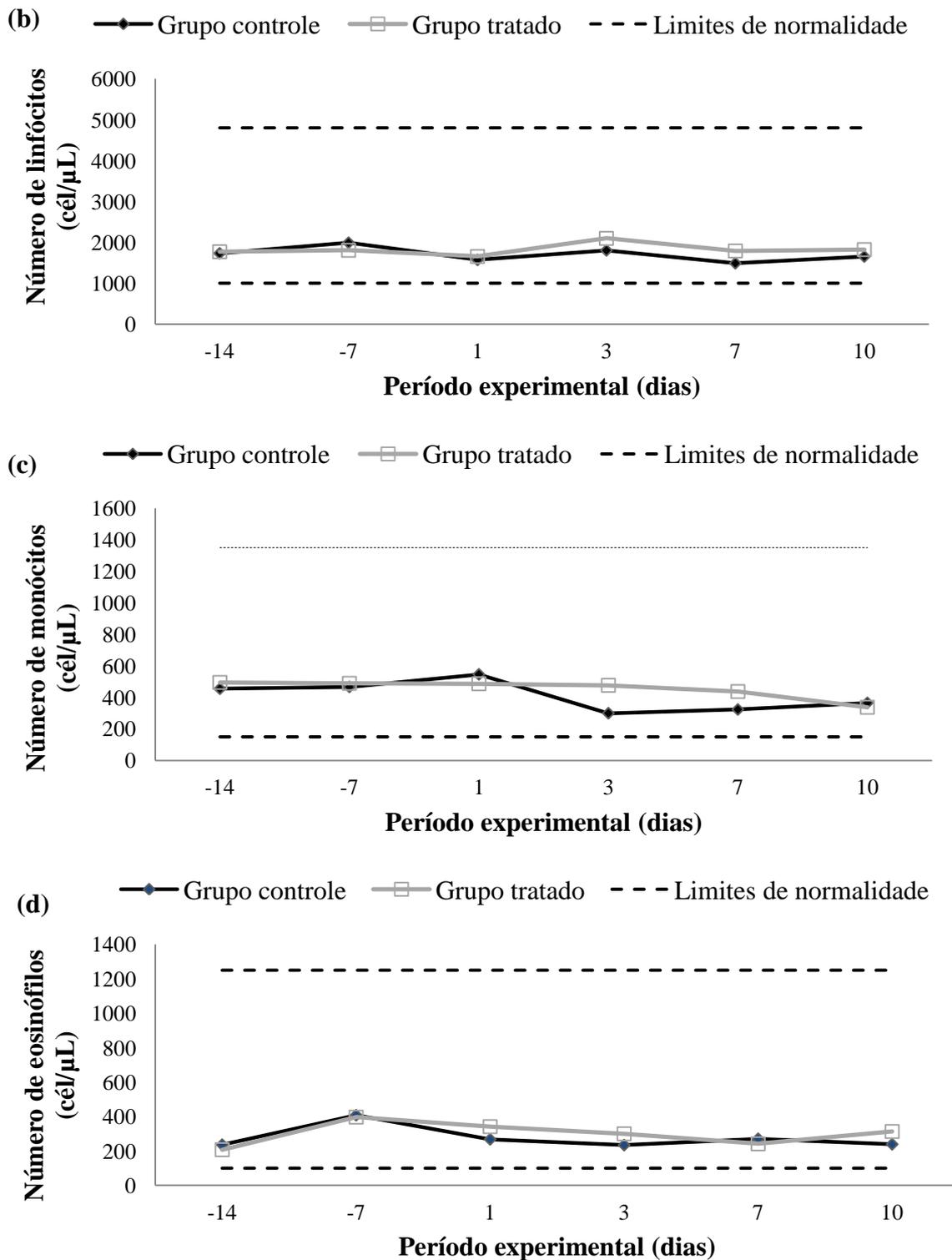


Figura 11. Número de neutrófilos segmentados (a), linfócitos (b), eosinófilos (c) e monócitos (d) (cél/μL) respectivamente, com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

As médias e os desvios padrões das contagens de plaquetas dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 19.

Respectivamente para esses dias experimentais, as médias de plaquetas dos animais do grupo controle foram: 234.875; 268.250; 268.750; 285.250; 244.000; 287.875 e do grupo tratado foram: 258.250; 259.250; 258.625; 280.625; 256.625; 283.750.

A principal função das plaquetas é a prevenção das perdas sanguíneas (hemostasia) por meio da manutenção da integridade do endotélio vascular, especialmente dos capilares; reparação de danos menores do endotélio pela adesão ao colágeno subendotelial e ativação e aceleração do processo de coagulação sanguínea (KERR, 2003; BUSH, 2004).

A maioria dos aumentos na contagem de plaquetas é de curta duração e pouca intensidade. Já as causas mais frequentes de trombocitopenia estão relacionadas à diminuição da produção pela medula óssea e/ou aumento da destruição ou consumo plaquetário (BUSH, 2004).

Tabela 19. Médias e desvios padrões das contagens de plaquetas (cél/μL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	234.875 ^a	268.250 ^a	268.750 ^a	285250 ^a	244.000 ^a	287.875 ^a
	DP	23.907,19	39.744,72	45.871,72	62.183,48	40.816,66	82.106,96
Tratado	Média Ar.	258.250 ^{Aa}	259.250 ^{Aa}	258.625 ^{Aa}	280.625 ^{Aa}	256.625 ^{Aa}	283.750 ^{Aa}
	DP	69.917,81	45.424,19	30.593,83	40.574,23	20.113,52	42.857,74

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si (p> 0,05).

Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos controle e tratado antes e após o tratamento. Todos os animais, em ambos os grupos, para todos os dias de avaliação, apresentaram contagens de plaquetas dentro da normalidade. A análise estatística realizada no grupo tratado comparando-se a média pré-tratamento com a média de cada tempo após o tratamento demonstrou que não ocorreu diferença significativa entre as mesmas.

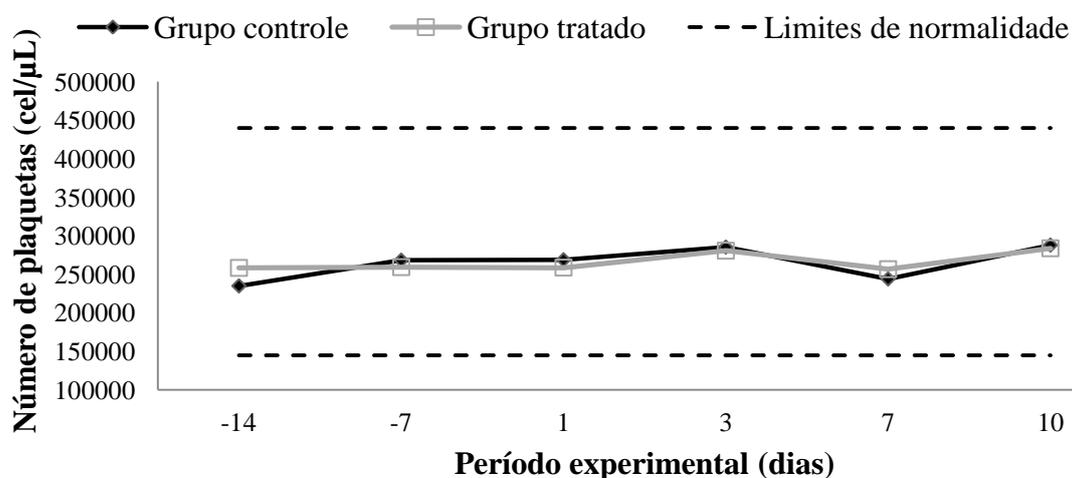


Figura 12. Número de plaquetas (cél/μL) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

4.2.5 Exame bioquímico

As médias e os desvios padrões das concentrações de proteína plasmática total (PPT) dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 encontram-se registrados na Tabela 20.

Respectivamente para esses dias experimentais, as médias de proteína plasmática total dos animais do grupo controle foram: 7,20; 7,25; 7,23; 7,15; 7,13; 7,23 e do grupo tratado foram: 7,25; 7,08; 7,18; 7,13; 7,15; 7,05.

Tabela 20. Médias e desvios padrões das concentrações de proteína plasmática total (g/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	7,20 ^a	7,25 ^a	7,23 ^a	7,15 ^a	7,13 ^a	7,23 ^a
	DP	0,30	0,26	0,23	0,23	0,21	0,31
Tratado	Média Ar.	7,25 ^{Aa}	7,08 ^{Aa}	7,18 ^{Aa}	7,13 ^{Aa}	7,15 ^{Aa}	7,05 ^{Aa}
	DP	0,30	0,21	0,25	0,26	0,21	0,26

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Não foram verificadas diferenças significativas entre as médias dos grupos controle e tratado, nem nenhum animal, em ambos os grupos, apresentou valores fora dos limites da normalidade antes ou após o tratamento. A análise estatística para o grupo tratado comparando-se a média pré-tratamento com a média de cada tempo após o tratamento demonstrou que não ocorreu aumento significativo entre as mesmas.

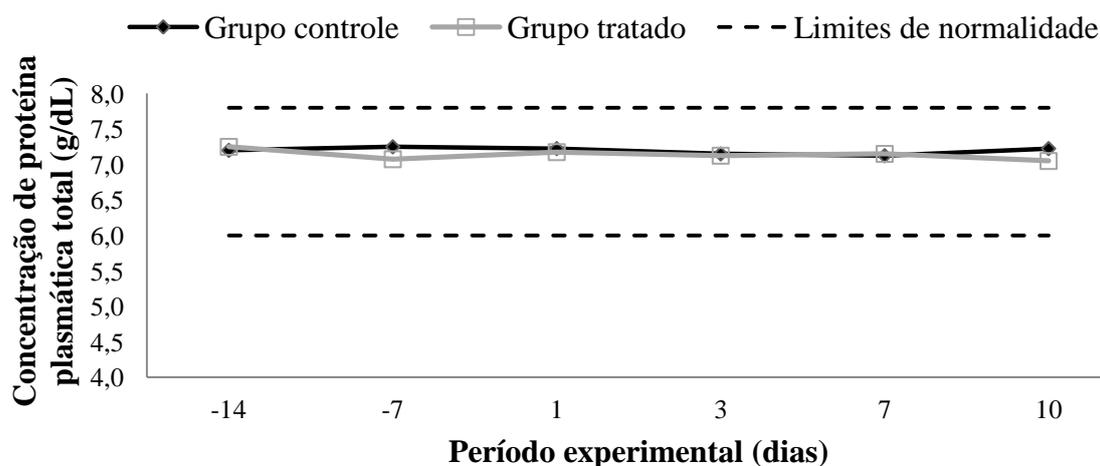


Figura 13. Concentração de proteína plasmática total (g/dL) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle do grupo controle e tratado com coumafós.

Para avaliar a possibilidade de lesões celulares em hepatócitos e alterações relacionadas à colestase em canalículos biliares mediante o uso do produto, avaliou-se as atividades plasmáticas das enzimas hepáticas de vazamento alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), e também as enzimas de colestase Fosfatase Alcalina e Gama-Glutamil-Transferase (GGT).

As médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas de ALT dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 encontram-se na Tabela 21. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 33,25; 23,50; 30,00; 17,88; 22,13; 30,38 e do grupo tratado foram: 43,75; 28,88; 35,25; 22,25; 34,88; 38,25.

Tabela 21. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas de alanina aminotransferase (ALT) (U/L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	33,25 ^a	23,50 ^a	30,00 ^a	17,88 ^a	22,13 ^a	30,38 ^a
	DP	10,28	12,85	9,64	8,29	10,51	11,53
Tratado	Média Ar.	43,75 ^{Aa}	28,88 ^{Aa}	35,25 ^{Aa}	22,25 ^{Ba}	34,88 ^{Aa}	38,25 ^{Aa}
	DP	18,78	10,19	15,75	12,77	21,18	24,98

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, B} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Não foram verificadas diferenças significativas na comparação entre os grupos controle e tratado.

A análise estatística realizada no grupo tratado comparando-se os resultados pré-tratamento com cada tempo após o tratamento demonstrou ter ocorrido diferença entre o dia +3 e os demais dias experimentais. Entretanto, não se relacionou este achado a nenhuma possível reação adversa que poderia ser atribuída ao uso do produto, pois o esperado para uma possível toxicidade aguda causada pelo uso do coumafós seria um aumento da atividade enzimática, não uma diminuição.

Três animais apresentaram valores abaixo da normalidade no grupo controle (8,0 e 9,0 no dia -7; e 7,0 no dia +3; limites de referência: 10,0 a 88,0 U/L) e um no grupo tratado (9,0 no dia +3). Todavia, este resultado não é compatível com a ocorrência de lesão hepatocelular ou qualquer outro indício de toxicidade aguda provocada pelo uso do produto, pois segundo Kerr (2003), valores de atividade enzimática abaixo da normalidade não possuem muita importância na avaliação clínica de um paciente, e apenas nos casos de hipoplasia ou atrofia de algum órgão este achado de fato possuiria valor diagnóstico. Mesmo que esta fosse a situação, outros achados confirmariam esta ocorrência, fato que não aconteceu.

Apenas um animal no grupo tratado apresentou valor acima do limite superior de normalidade, porém não se correlacionou este achado ao tratamento, visto que, a intensidade do aumento foi muito discreta. Além disso, deve-se levar em conta que os resultados deste animal, especificamente, se apresentaram muito variáveis durante todo o período de avaliação, estando hora ascendente, hora descendente (79,0 no dia -14; 29,0 no dia -7; 55,0 no dia +1; 47,0 no dia +3; 81,0 no dia +7 e 90,0 U/L no dia +10).

As médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas de AST dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão na Tabela 22. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 19,13; 16,88; 21,38; 13,50; 17,25; 23,00 e do grupo tratado foram: 24,38; 18,38; 21,13; 14,63; 23,75; 27,50.

Tabela 22. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas de aspartato aminotransferase (AST) (U/L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	19,13 ^a	16,88 ^a	21,38 ^a	13,50 ^a	17,25 ^a	23,00 ^a
	DP	4,09	7,10	5,18	5,13	4,71	4,60
Tratado	Média Ar.	24,38 ^{Aa}	18,38 ^{Aa}	21,13 ^{Aa}	14,63 ^{Ba}	23,75 ^{Aa}	27,50 ^{Aa}
	DP	13,93	8,94	4,02	8,28	15,13	13,36

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, B} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Não se observou diferenças significativas entre as médias dos grupos controle e tratado. A análise estatística realizada no grupo tratado comparando-se a média pré-tratamento com a média de cada tempo após o tratamento demonstrou que ocorreu diferença entre a média do dia +3 e os demais dias experimentais, tendo havido uma discreta diminuição. Dois animais apresentaram valores abaixo da normalidade no dia -7 (8,0 e 9,0; limites de referência de 10 a 88 U/L). Porém, este achado não é condizente à ocorrência de efeito tóxico do produto, uma vez que, este fato tenha ocorrido antes do tratamento e a redução da atividade enzimática da AST não possui relevância clínica patológica (KERR, 2003; BUSH, 2004).

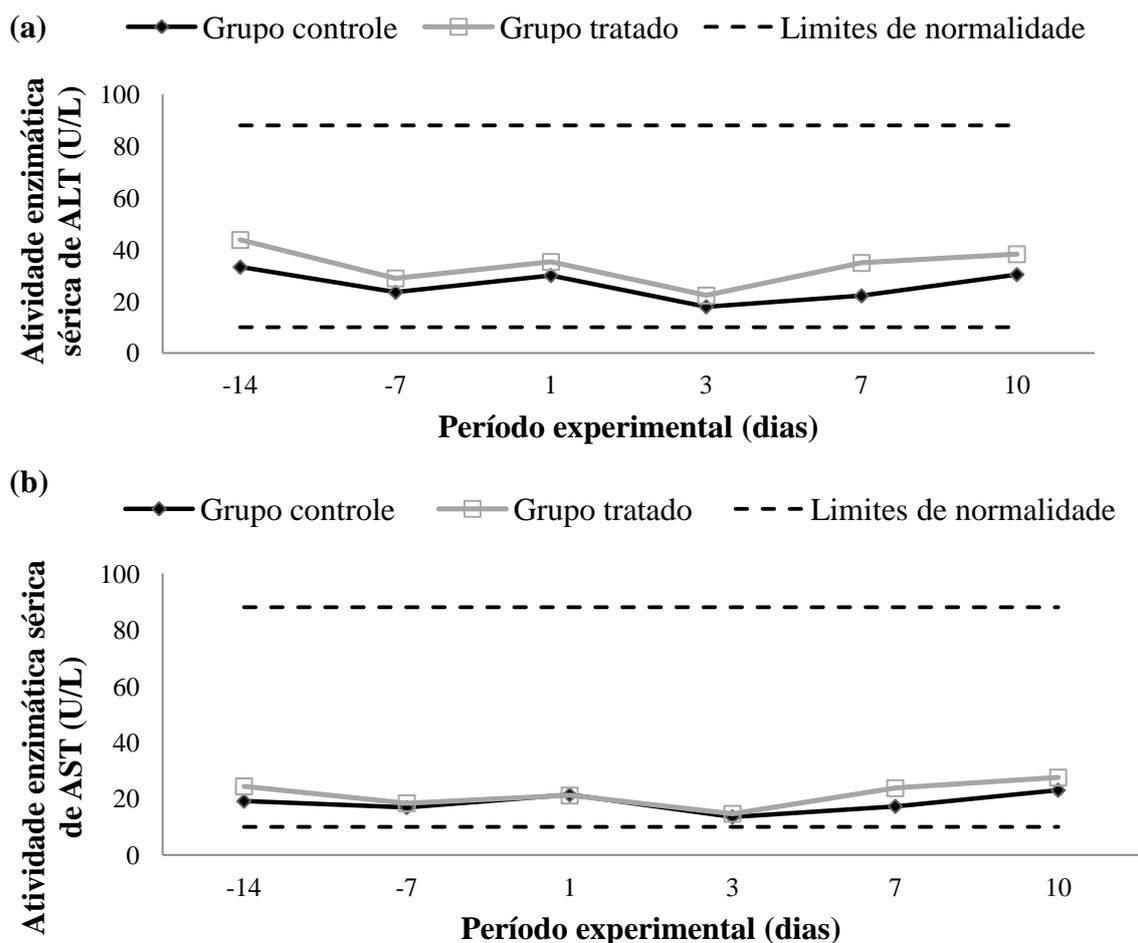


Figura 14. Atividade enzimática sérica de alanina aminotransferase (ALT) (U/L) (a) e aspartato aminotransferase (AST) (U/L) (b) respectivamente, com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle do grupo controle e tratado com coumafós.

As médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas de Fosfatase Alcalina dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 23 a seguir. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 61,63; 50,75; 57,38; 36,38; 39,00; 55,50 e do grupo tratado foram: 56,88; 46,88; 57,13; 31,88; 37,75; 47,13.

Tabela 23. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas de fosfatase alcalina (U/L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	61,63 ^a	50,75 ^a	57,38 ^a	36,38 ^a	39,00 ^a	55,50 ^a
	DP	12,39	24,96	20,27	17,26	11,29	23,67
Tratado	Média Ar.	56,88 ^{Aa}	46,88 ^{Aa}	57,13 ^{Aa}	31,88 ^{Ba}	37,75 ^{Aa}	47,13 ^{Aa}
	DP	32,30	26,64	30,83	18,88	14,85	20,95

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, B} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tratado antes e após o tratamento. Um animal do grupo controle apresentou resultado de 19,0 U/L no dia +3 (limite de normalidade: 20 a 150 U/L). Porém, esta queda na atividade da fosfatase alcalina de maneira eventual e isolada não possui nenhum significado patológico, devendo ser atribuída a uma oscilação momentânea deste animal, que nos dias seguintes, tornou a apresentar valores dentro da normalidade. Além disso, a alteração foi observada no grupo controle. Portanto, descarta-se a possibilidade de efeito do tratamento neste achado.

A análise estatística realizada no grupo tratado nos diferentes tempos, comparando-se os valores pré-tratamento com cada tempo pós-tratamento, demonstrou ter ocorrido diferença significativa entre o dia +3 e os demais dias experimentais com a média apresentando menor resultado nesta data (31,88 U/L). Ainda no grupo tratado, dois animais apresentaram valores abaixo do limite de referência estabelecidos, durante alguns dias de avaliação (animal 13: 14; 14; 8; 10 e 18 U/L respectivamente para os dias -7; +1; +3; +7; +10; e animal 15: 17 e 18 U/L, respectivamente para os dias -7 e +3). Todavia, este achado não é compatível com possíveis reações adversas observadas após o uso do produto, pois, como já mencionado anteriormente, na discussão das outras duas enzimas hepáticas anteriores, a redução da atividade enzimática na ausência de sinais clínicos condizentes, não representa valor diagnóstico. Estas variações devem ser consideradas oscilações inerentes ao animal não devendo ser atribuída a um efeito do tratamento, pois, mesmo antes do tratamento a enzima já se mostrava com atividade reduzida em um deles e ambos se apresentaram clinicamente normais durante todo o estudo.

As médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas de GGT dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 24 a seguir. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 2,00; 2,38; 1,13; 2,00; 1,00; 1,25 U/L e do grupo tratado foram: 2,13; 2,00; 1,13; 2,25; 1,25; 2,63 U/L.

Tabela 24. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas de gama glutamil-transferase (GGT) (U/L) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	2,00 ^a	2,38 ^a	1,13 ^a	2,00 ^a	1,00 ^a	1,25 ^a
	DP	0,53	1,00	0,99	1,07	0,53	0,89
Tratado	Média Ar.	2,13 ^{Aa}	2,00 ^{Aa}	1,13 ^{Aa}	2,25 ^{Aa}	1,25 ^{Ba}	2,63 ^{Aa}
	DP	0,99	1,41	0,83	1,67	1,04	3,11

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, B} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Não foi verificada diferença significativa entre os grupos controle e tratado antes e após o tratamento.

Alguns animais em ambos os grupos apresentaram valores abaixo da normalidade antes e após o tratamento, obtendo-se como resultado valor 0,0 U/L. Embora Kerr (2003) e Bush (2004) mencionem que apenas em gatos a GGT pode apresentar valores nulos, sendo consideradas, em certas situações, virtualmente indetectáveis, observamos neste estudo que, os cães também, quando na ausência de enfermidade que provoquem efeitos colestáticos, com subsequentes aumentos enzimáticos de Fosfatase Alcalina e GGT, esta também pode se apresentar nula pelo método analítico adotado nesta pesquisa.

Tal achado inclusive, não possui relevância diagnóstica e não se deve ser associado à ocorrência de possíveis reações adversas encontradas após o uso do produto, pois sabe-se que, salvo raras exceções, a redução da atividade enzimática não possui relevância clínica na ausência de sinais clínicos concomitantes.

A análise estatística realizada no grupo tratado comparando-se os dados pré-tratamento com os diferentes tempos pós-tratamento demonstrou ter ocorrido diferença entre o dia +7 e os demais dias experimentais, mas que não diferiram do grupo controle para esta data, não devendo atribuir a variação a um possível efeito do tratamento.

Nenhum animal apresentou atividade enzimática da GGT acima do limite superior de normalidade.

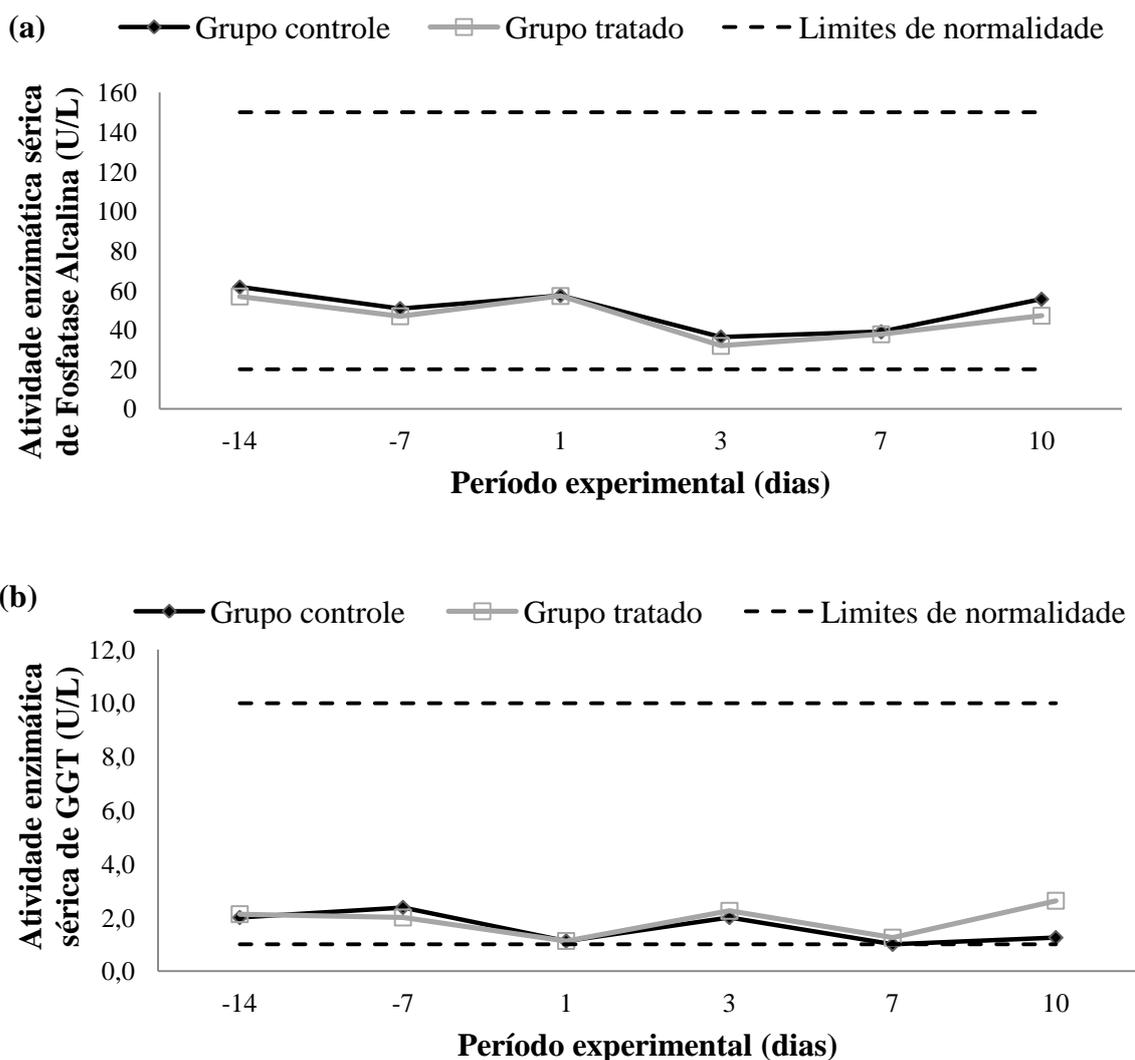


Figura 15. Atividade enzimática sérica da fosfatase alcalina (U/L) (a) e da gama glutamil-transferase (GGT) (U/L) (b) respectivamente, com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de um possível efeito nefrotóxico decorrente da excreção urinária do composto OF e subsequentemente, um comprometimento da função renal, foram determinadas as concentrações séricas de uréia e creatinina dos cães dos grupos controle e tratado.

As médias e os desvios padrões das concentrações séricas de uréia dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 25. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 43,25; 29,88; 46,25; 24,13; 32,88; 36,75 e do grupo tratado foram: 40,75; 28,25; 48,00; 27,25; 42,50; 44,75.

Tabela 25. Médias e desvios padrões das concentrações séricas de uréia (mg/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	43,25 ^a	29,88 ^a	46,25 ^a	24,13 ^a	32,88 ^a	36,75 ^a
	DP	22,08	11,12	25,36	14,91	17,55	15,77
Tratado	Média Ar.	40,75 ^{Aa}	28,25 ^{Aa}	48,00 ^{Ba}	27,25 ^{Aa}	42,50 ^{Aa}	44,75 ^{Aa}
	DP	24,26	12,04	27,43	13,46	30,52	28,06

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, B} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Alguns animais, em ambos os grupos, apresentaram valores acima da normalidade antes e após o tratamento.

No grupo controle, é possível observar que três animais, especialmente, apresentaram seus valores acima da normalidade repetidas vezes durante o estudo, mas que em alguns momentos, os valores decrescem numa oscilação completamente aleatória.

Nesse caso, pode-se atribuir tal fato a uma variação individual para estes cães em questão, pois em se tratando do parâmetro analisado, sabe-se que outros fatores, não renais, como aumento de catabolismo proteico, pela dieta rica em proteínas e desidratação (apresentando valores de maiores que 40 mg/dL, excepcionalmente chegando acima de 100 mg/dL), podem estar associados a aumentos leves a moderados da uréia, sem que haja relação com o comprometimento da função renal (BUSH, 2004).

Já no grupo tratado, foi observada diferença significativa no dia +1, ao ser comparado o período pré-tratamento com cada momento pós-tratamento. Vários animais excederam o limite superior de referência neste dia, em discretos a moderados aumentos (44,0; 41,0; 48,0; 64,0; 107,0 mg/dL; limites de normalidade: 15 a 40 mg/dL). Todavia, não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo controle nesta mesma tomada de tempo, nem ocorrência de outros sinais clínicos ou aumentos na creatinina que apontassem para problemas renais em virtude do uso do coumafós. Dessa forma, não se deve atribuir tal resultado como sendo decorrente do efeito do tratamento.

Além disso, tal como foi observado no grupo controle, no grupo tratado também se verificou que, certos cães que apresentavam resultados acima do normal, tinham seus valores excedentes em diversos momentos de avaliação, sem apresentar, no entanto, um comportamento tendencioso a declínio ou ascendência, podendo ser atribuído a uma variação individual, ou a uma causa não-renal para este aumento discreto a moderado na concentração de uréia sérica.

Segundo Bush (2004), apenas concentrações acima de 100 a 120 mg/dL são consideradas clinicamente significantes e aumentos discretos não são necessariamente resultantes de uma insuficiência renal. Alterações relacionadas a possíveis enfermidades estão associadas principalmente a problemas hormonais, catabolismo alterado e alterações renais.

No presente estudo, as elevações observadas sugerem ser de caráter nutricional, pois estão presentes em ambos os grupos, antes e após o tratamento, sem aumento significativo dentro do grupo tratado, quando comparadas as médias pré e pós-tratamento.

São descartadas possíveis alterações em função renal, pois ao considerarmos os valores de creatinina, um parâmetro mais fidedigno para avaliação da função renal (KERR, 2003; BUSH, 2004), estes não estiveram acima do limite de normalidade em nenhum momento do estudo.

Alguns animais também apresentaram valores abaixo da normalidade, em ambos os grupos controle e tratado, com decréscimos insignificantes abaixo do limite inferior de 15 mg/dL (12 mg/dL; 13 mg/dL e 14 mg/dL). Tais achados (três animais no controle e um no tratado) podem ser atribuídos a oscilações casuais destes animais. Tal como alguns cães apresentaram-se margeando limites superiores de normalidade, outros mantiveram-se próximos aos níveis inferiores e, por vezes, mostraram-se abaixo do limite de referência, sem que houvesse, na verdade, causa clínica aparente.

As médias e os desvios padrões das concentrações séricas de creatinina dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 estão registrados na Tabela 26. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 0,86; 0,64; 0,74; 0,46; 0,61; 0,76 e do grupo tratado foram: 0,84; 0,79; 0,79; 0,50; 0,81; 0,80.

Tabela 26. Médias e desvios padrões das concentrações séricas de creatinina (mg/dL) dos cães dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	0,86 ^a	0,64 ^a	0,74 ^a	0,46 ^a	0,61 ^a	0,76 ^a
	DP	0,24	0,20	0,21	0,17	0,24	0,16
Tratado	Média Ar.	0,84 ^{Aa}	0,79 ^{Aa}	0,79 ^{Aa}	0,50 ^{Ba}	0,81 ^{Ab}	0,80 ^{Aa}
	DP	0,25	0,22	0,28	0,12	0,32	0,20

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, Bb} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Como indicadora da função renal, prefere-se a creatinina à uréia, porque é menos afetada pela variedade de fatores não renais que influenciam as concentrações de uréia (KERR, 2003; BUSH, 2004). Porém, a uréia também possui importância diagnóstica, pois além de avaliar função hepática, auxilia na avaliação da função renal, uma vez que, quando analisada em conjunto com os resultados de creatinina, a uréia pode representar uma confirmação para os resultados alterados deste metabólito. À medida que a creatinina excede seu limite superior, o aumento de uréia será mais acentuado e em maior proporção que pelas outras causas não-renais.

Seis animais no grupo controle – um antes do dia do tratamento e cinco após o tratamento – apresentaram valores de concentração sérica de creatinina abaixo da normalidade (0,3 mg/dL, no dia -7; 0,3; 0,3; 0,4; 0,4 e 0,4 mg/dL no dia +3; limites de referência: 0,5 a 1,5 mg/dL). Porém, por se tratar do grupo controle, não se atribuiu este achado ao efeito do tratamento. Além disso, segundo a literatura, decréscimos no valor de creatinina não possuem relevância diagnóstica (KERR, 2003), devendo ser atribuído a um problema de acurácia pela perda progressiva do analito na amostra com o tempo, não possuindo causa patológica.

A análise estatística para o grupo tratado comparando-se os resultados pré-tratamento com cada tempo pós-tratamento demonstrou ter ocorrido diferença entre os dados pré-

tratamento com o dia +3. Dois cães apresentaram valores inferiores ao limite mínimo (0,3 e 0,4mg/dL no dia +3). Entretanto, este achado não é compatível com possíveis reações adversas que pudessem ser observadas mediante o uso do produto, uma vez que, a ocorrência de uma nefrotoxicidade se traduziria em aumento da concentração sérica deste metabólito, não uma diminuição deste. A justificativa para tal achado pode ser atribuída à mesma causa que do grupo controle citada anteriormente.

Ao comparar os dados dos grupos controle e tratado no dia +7, observou-se que houve diferença significativa entre eles. Porém, nenhum animal excedeu o limite superior de referência. Além disso, não houve diferença significativa na comparação dos resultados desses animais do grupo tratado no período pré-tratamento com o pós-tratamento. Sendo assim, considerou-se que não houve alteração na função renal decorrente do uso do produto testado.

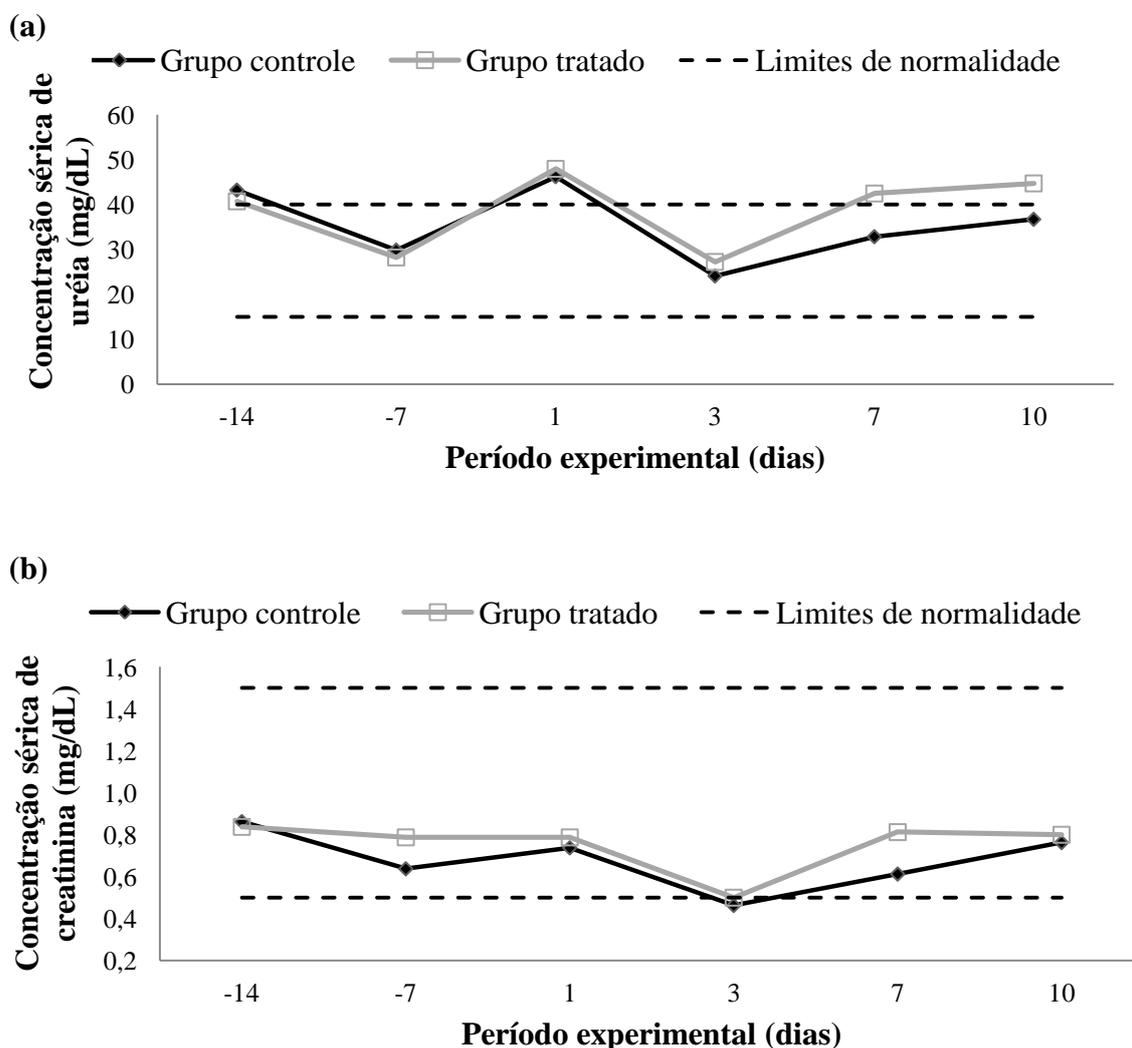


Figura 16. Concentração sérica de uréia (mg/dL) (a) e creatinina (mg/dL) (b) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle do grupo controle e tratado com coumafós.

4.2.6 Avaliação da atividade enzimática da colinesterase sérica

Um dos alvos de efeito tóxico da ação dos parasiticidas inibidores da colinesterase, a colinesterase plasmática ou pseudocolinesterase, pode ser usada para diagnóstico de intoxicação por OFs (TECLES; CERÓN, 2001; CHEN et al., 2009).

As médias e os desvios padrões das atividades enzimáticas da colinesterase sérica dos animais dos grupos controle e tratado nos dias -14, -7, +1, +3, +7 e +10 encontram-se na Tabela 27. Respectivamente para esses dias experimentais, as médias do grupo controle foram: 3158,00; 2995,50; 3572,13; 2141,75; 2673,75; 3793,50 e do grupo tratado foram: 3973,00; 3989,00; 2887,63; 1797,25; 3052,25; 3786,38.

Tabela 27. Médias e desvios padrões das atividades enzimáticas da colinesterase sérica (U/L) dos cães da raça Beagle dos grupos controle e tratado com coumafós.

GRUPOS		DIAS EXPERIMENTAIS					
		-14	-7	1	3	7	10
Controle	Média Ar.	3158,00 ^a	2995,50 ^a	3572,13 ^a	2141,75 ^a	2673,75 ^a	3793,50 ^a
	DP	698,61	940,84	837,79	727,05	871,20	961,16
Tratado	Média Ar.	3973,00 ^{Aa}	3989,00 ^{Aa}	2887,63 ^{Ba}	1797,25 ^{Ba}	3052,25 ^{Aa}	3786,38 ^{Aa}
	DP	1528,87	1605,56	1333,29	710,45	932,20	1180,25

Média Ar: média aritmética; DP: desvio padrão.

^{Aa, B} Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna e letras maiúsculas entre médias na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Em vista da escassez de artigos e relatos na literatura que estabeleçam valores de normalidade de colinesterase em cães, considerou-se os valores descritos por Abdelkader e Hauge (1986) como referência, pois este foi quem se enquadrou melhor aos resultados observados, principalmente no grupo controle e no período pré-tratamento do grupo tratado (2000 a 5000 U/L). Thong (1995) *apud* Saccaro (2007) também descreveram valores de referência para a atividade enzimática da colinesterase plasmática em cães da raça Beagle (de 860 a 3600 U/L) realizado pelo método de Ellman. No entanto, estes resultados não condizem aos achados no presente estudo. Além disso, torna-se inviável a comparação de resultados dos diferentes autores devido às diferenças metodológicas das técnicas empregadas. Sendo assim, além dos parâmetros de normalidade descritos por Abdelkader e Hauge (1986), também se levou em consideração a avaliação entre os grupos controle e tratado do presente estudo para título de comparação entre os valores nos tempos determinados.

Assim, seguindo os limites de referência estabelecidos por Abdelkader e Hauge (1986), três animais do grupo tratado apresentaram valores acima da normalidade no dia -14 e dois animais no dia -7 (5153; 5242; 5303, no dia -14; 5526; 5691 U/L, no dia -7). Tais achados, porém, não são compatíveis com possíveis reações adversas encontradas após o uso do produto, mesmo porque estes resultados foram obtidos antes de se instituir o tratamento. Embora Furlanello (2006) *apud* Saccaro (2007) tenha relatado que tal achado seja indicativo de fibrose ou cirrose hepática em cães, deveria haver sinais clínicos condizentes com a enfermidade para que se fechasse este diagnóstico, fato que não ocorreu neste estudo. Dessa forma, atribuímos este resultado a variação metodológica utilizada nesta pesquisa para a determinação da colinesterase sérica, o que conferiu aos animais resultados acima do que seria o limite superior de referência estabelecidos por outros autores, porém todos se apresentavam clinicamente saudáveis e sem quaisquer outras alterações laboratoriais que justificassem a anormalidade. Dessa forma, novos estudos deveriam ser conduzidos a fim de se estabelecer valores de referência para a raça em questão se utilizando de uma metodologia que se assemelhasse mais à empregada neste estudo. Assim, os limites de normalidade poderiam ser mais bem ajustados.

No grupo controle, quatro animais apresentaram valores abaixo da normalidade nos dias -7, +3, +7 e +10. Um deles apresentou resultados discretamente inferiores em todas as datas mencionadas (1845 no dia -7; 1988 no dia +7; 1912 U/L, no dia +10; tendo acontecido o decréscimo mais significativo no dia +3 com resultado de 1037 U/L). Outros dois animais apresentaram decréscimos em momentos isolados (1838 e 1919 U/L, respectivamente nos dias +3 e +7) e um animal apresentou valor abaixo de 2000 U/L nos dias +3 e +7 (1286; 1758 U/L). Contudo, por se tratar do grupo controle, estes resultados não podem ser atribuídos a um possível efeito tóxico decorrente do uso do produto. Além disso, a magnitude do decréscimo da atividade enzimática da colinesterase nesses animais não foi tão intensa a ponto de representar um dado de relevância clínica, e nenhum deles excedeu o valor de 1000 U/L (50% do limite inferior), o que poderia ser considerado preocupante para o surgimento de sinais clínicos, segundo Enzo (2006).

Em relação ao grupo tratado, um animal apresentou valores inferiores ao limite de normalidade durante todo o período experimental, tendo havido um decréscimo ainda maior, inferior a 1000U/L, nos dias experimentais pós-tratamento +1 e +3 (678 e 661 U/L, respectivamente). Este achado sim pode ser considerado importante na avaliação de toxicidade causada por OFs, uma vez que, é esperada uma diminuição da atividade enzimática em decorrência de intoxicação por tais compostos (ABDELSALAM, 1987). Nos dias de avaliação posteriores, seus valores subiram novamente, 1442 U/L no dia +7, chegando a 1966 U/L no dia +10, porém não alcançou o limite inferior de 2000 U/L em nenhum momento. Dessa forma, pode-se concluir que, para este animal em questão, os dois últimos resultados e os dados pré-tratamento (1125 e 1195 U/L para os dias -14 e -7, respectivamente) podem ser atribuídos a uma variação individual do animal para a enzima em questão, pois ele se apresentou clinicamente normal durante todo o estudo e seus valores se mostraram decrescidos desde a primeira avaliação pré-tratamento. Todavia, é evidente que o produto testado, por mais que não tenha causado sinais clínicos de intoxicação, levou a um decréscimo da atividade enzimática da colinesterase sérica principalmente nos dias +1 e +3.

Quanto aos demais animais do grupo tratado, além do animal mencionado anteriormente, mais um cão apresentou redução da atividade da colinesterase no dia +1 (1632 U/L), e embora nenhum animal a mais tenha ficado abaixo do limite inferior de normalidade nesta data, observou-se diferença significativa ao compararmos o período pré-tratamento com o pós-tratamento para o dia +1 (as médias pré-tratamento foram 3973 e 3989 U/L, respectivamente para os dias -14 e -7; enquanto que no dia +1 foi 2887,63 U/L).

Também foi observada diferença significativa na comparação do dia experimental +3 com o período pré-tratamento. No dia +3 foi alcançada a média de 1797,25 U/L para este dia, a menor do estudo.

A redução, abaixo do limite inferior, observada no terceiro dia após o tratamento ocorreu em sete animais, que apresentaram os seguintes resultados: 1862; 1544; 661; 1744; 1703; 1892; 1710U/L. Contudo, Enzo (2006) relatou que os efeitos tóxicos do uso de compostos OFs são observados apenas nos casos em que a atividade enzimática da colinesterase está abaixo de 50%, ou seja, abaixo de 1000 U/L, se considerarmos os limites de referência de Abdelkader e Hauge (1986). Isso justifica o fato de não terem sido observados sinais clínicos de intoxicação em nenhum dia de avaliação destes animais, nem mesmo para o animal que, de fato, apresentou valores inferiores a 1000 U/L nas datas +1 e +3, mencionado anteriormente.

Entretanto, ao se observar este resultado conclui-se que o dia +3 representou o momento crítico para a redução da atividade enzimática da colinesterase.

Quanto aos demais dias, no dia +7, apenas dois cães mantiveram os valores de atividade enzimática ainda abaixo de 2000 U/L (1883 e 1442 U/L), enquanto que, no dia +10, o mesmo animal que apresentou resultado de 1442 U/L no dia +7, apresentou novamente resultado abaixo de 2000 U/L (1966 U/L). Entretanto, vale lembrar que este mesmo animal é

o cão citado anteriormente que durante todo o estudo apresentou valores abaixo do limite inferior de normalidade.

Os demais animais do grupo tratado retornaram com seus valores para dentro da faixa de normalidade nos dias +7 e +10 e as médias de ambos os grupos controle e tratado chegaram a ficar até muito próximas (3793,5 do grupo controle e 3786,38 do grupo tratado) para o último dia, o que nos leva a supor que, tão logo a metabolização e excreção do composto aconteçam, o produto então já não mais oferecerá mais risco de toxicidade aos cães, pois já terá sido eliminado do organismo do animal.

Embora o dia +3 tenha se mostrado ser o momento mais crítico para a inibição da colinesterase, nos dias +7 e +10 praticamente todos os animais se recuperaram.

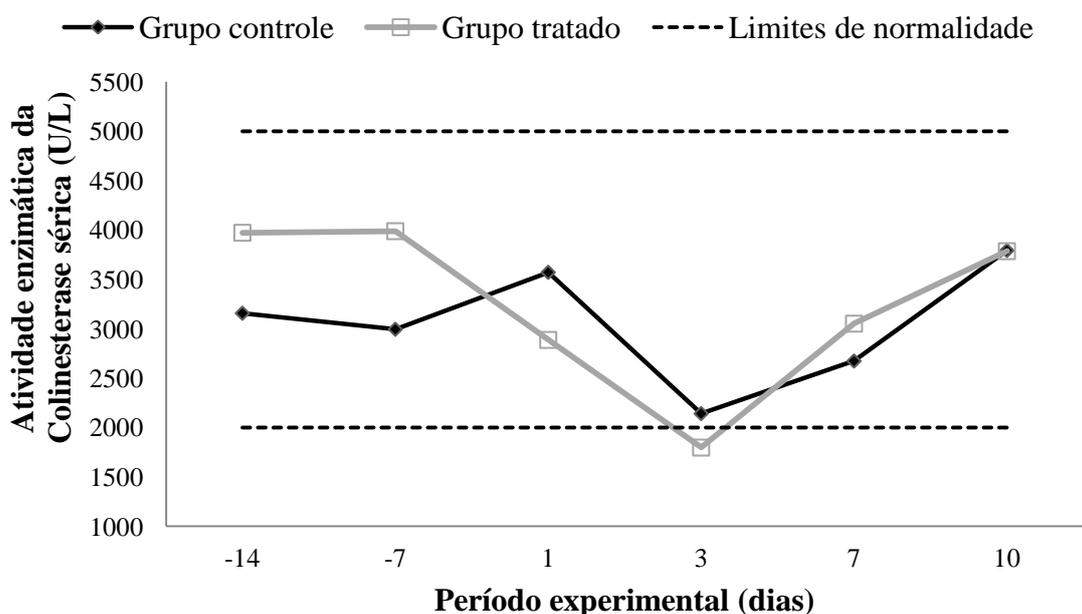


Figura 17. Atividade da colinesterase sérica (U/L) com valores de referência (limite máximo e mínimo) dos cães da raça Beagle do grupo controle e tratado com coumafós.

5 CONCLUSÕES

O uso do coumafós sob a formulação de sabonete parasiticida apresentou eficácia carrapaticida para *Rhipicephalus sanguineus* e pulguicida para *Ctenocephalides felis felis* em cães ao ser realizada uma avaliação 48 horas após seu uso nos animais infestados experimentalmente. Porém, não foi eficaz num segundo momento de avaliação (dia +7) após ter sido feita uma nova infestação cinco dias após seu uso.

O coumafós se mostrou seguro clinicamente, pois não provocou alterações nos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos analisados, que denotassem lesão hepática ou comprometimento da função renal dos animais submetidos a tratamento, embora com 72 horas pós-tratamento tenha sido observado um maior efeito inibitório sobre a atividade enzimática da colinesterase sérica nos cães. Porém, não houve sinais clínicos condizentes com uma possível intoxicação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As propriedades farmacológicas e os possíveis efeitos tóxicos de um composto organofosforado já estão descritos na literatura e embora algumas pesquisas relatem a ocorrência de resistência por algumas cepas de carrapatos – principalmente em bovinos, o coumafós, mesmo após anos do seu desenvolvimento e uso, ainda se mostra eficaz no controle de pulgas e carrapatos em cães.

Ao avaliarmos a eficácia de uma formulação, não devemos nos ater apenas à sua base química e seu efeito residual, sem considerarmos sua apresentação comercial, que reflete diretamente ao quê o produto se propõe como antiparasitário.

Embora o sabonete testado neste estudo não tenha apresentado eficácia residual, é importante ressaltarmos algumas considerações importantes antes de julgarmos o produto como ineficaz no controle de ectoparasitas.

Com o investimento em pesquisas e desenvolvimento de novos pesticidas, assistimos nas últimas décadas ao surgimento de inúmeras bases químicas, com seletividades cada vez mais restritas aos parasitas-alvo, com menor efeito tóxico ao hospedeiro e também ao meio ambiente, nas mais diversificadas formas de apresentação (como coleiras, sabonetes, spot-on, xampus, vacinas, dentre outras). Por isso, muitas vezes, torna-se difícil para o proprietário e para o médico veterinário a escolha do produto mais adequado para ser usado nos seus animais de companhia para o controle do parasitismo em questão. Com isso, na maioria dos casos, por desconhecimento dos profissionais e proprietários ou por recomendações errôneas ou equivocadas, estes são levados a pensar que o produto de maior efeito residual e maior eficácia seriam os mais adequados em todas as situações, esquecendo-se de avaliar outros critérios também fundamentais que poderiam ajudá-los a pensar no produto ideal para cada caso.

Os sabonetes parasiticidas, embora apresentem curto período residual, também apresentam vantagens em relação aos novos antiparasitários mais modernos. Ao levarmos em consideração que os cães geralmente são banhados semanalmente por seus proprietários, ou levados às lojas de “pet-shops” para higienização periódica, o curto espaço entre um banho e outro poderiam garantir proteção ao cão sem que houvesse a necessidade de aplicar produtos de longa duração. Além disso, nos casos em que os cães são criados dentro de apartamentos e casas – condições estas menos favoráveis ao desenvolvimento dos parasitas no ambiente (tomadas às devidas precauções e cuidados complementares através de manejos que não somente o químico), o banho com sabonete parasiticida seria ideal no controle do parasitismo, visto que, os estágios de vida livre do parasita representam a maior parcela do número destes no nicho ao qual se encontra o hospedeiro.

Outra vantagem observada com o uso de sabonetes antiparasitários é a questão estética. Na maioria das vezes, inclusive na formulação testada neste estudo, os sabonetes apresentam odor agradável e deixam o pelo do animal mais macio e limpo, podendo ser uma boa opção aos “pet-shops” que oferecem o serviço de banho aos seus clientes. Além de perfumados, os animais sairiam “protegidos” de infestações parasitárias.

O baixo custo deste tipo de produto também é outra vantagem observada, já que, em muitos casos, o preço é o limitante na escolha de um produto antiparasitário por um proprietário.

Além da eficácia, o sabonete demonstrou ser seguro clinicamente, pois seu efeito tóxico não foi capaz de causar alterações clínicas detectáveis através dos exames clínicos e laboratoriais realizados. Até mesmo para a colinesterase sérica, principal alvo toxicológico desta classe de compostos, sua ação inibitória não foi tão intensa a ponto de causar efeitos clínicos adversos aparentes nos animais.

Assim, conclui-se que antes de se instituir um produto antiparasitário no controle de uma infestação, deve-se levar em conta as propriedades químicas de cada base farmacológica, sua finalidade e exatamente ao que se propõe como ectoparasiticida, além de pesar as vantagens e desvantagens da escolha a ser tomada. Pois, somente através de estratégias integradas, que visem de fato uma boa relação custo-benefício, garantindo eficácia e segurança, é que se conseguirá estabelecer as medidas mais adequadas para o controle de ectoparasitas nos animais de companhia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELKADER, S.V.; HAUGE J.G. Serum enzyme determination in the study of liver disease in dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum**, v. 27, n. 1, p. 59 - 70, 1986.
- ABDELSALAM, E.B. Organophosphorus compounds. I. Toxicity in domestic animals. **Veterinary Research Communications**, v.11, n.3, p. 211-219, 1987.
- ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K. ; BAHIENSE, T.C.; PERINOTTO, W.M.S.; MORAES, A.P.R.; TERRA, A.L.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317-322, 2010.
- ARROWSMITH, J.E. The neuromuscular junction. **Basic Science**, v.25, n.3, p. 106-112, 2007.
- ARTHER, R.G. Mites and Lice: Biology and Control. **Veterinary Clinical of Small Animal**, v.39, n.6, p.1159–1171, 2009.
- ASTROFF, A.B.; FRESHWATER, K.J.; EIGENBERG, D.A. Comparative Organophosphate-Induced Effects Observed In Adult And Neonatal Sprague–Dawley Rats During The Conduct Of Multigeneration Toxicity Studies. **Reproductive Toxicology**, v. 12, n. 6, p. 619–645, 1998.
- BEUGNET, F. Antiparasitaires externes chez les carnivores domestiques. **EMC-Vétérinaire**, v.1, n. 4, p.138–153, 2004.
- BICALHO, K.A.; FERREIRA, F.; BORGES, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. In vitro evaluation of the effects of some acaricides on life stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.548-552, 2001.
- BISSINGER, B.W., ROE, R.M. Tick repellents: Past, present, and future. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.96, p.63–79, 2010.
- BITAM, I.; DITTMAR, K.; PAROLA, P.; WHITING, M.F.; RAOULT, D. Fleas and flea-borne diseases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p.667–676, 2010.
- BLAGBURN, B.L.; DRYDEN, M.W. Biology, Treatment, and Control of Flea and Tick Infestations. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p.1173–1200, 2009.
- BORGES, L.M.F.; SOARES, S.F.; FONSECA, I.N.; CHAVES, V.V.; LOULY, C.C. B. Resistência acaricida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil, **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP**, v. 36, n.1, 2007. <Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/1820/1737>>
- BREMER, W.G.; SCHAEFER, J.J.; WAGNER, E.R.; EWING, S.A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G.R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D.L.; STICH, R.W. Transstadial and

intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v.131, p.95–105, 2005.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: ROCA LTDA, 2004.

CABRINI, T. M.; NAHUN, A.G.; CERINO, A. C.; BISSOLI, E.D.A.G.; COSTA, J.L.O.; PENA, S.B. Intoxicação por Organofosforado em cão - Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.9, 2007.

CARLOTTI, D.N.; JACOBS, D.E. Therapy, control and prevention of flea allergy dermatitis in dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, v.11, p.83-98, 2000.

CAVALIERE, M.J.; CALORE, E.E.; PEREZ, N.M.; PUGA, F.R. Miotoxicidade por organofosforados. **Rev. Saúde Pública**, v.30, n.3, p.267-72, 1996.

CHARPENTIER, A.; MENOZZI, P.; MARCEL, V.; VILLATTE, F.; FOURNIER, D. A Method to Estimate Acetylcholinesterase-Active Sites and Turnover in Insects. **Analytical Biochemistry**, v.285, p. 76–81, 2000.

CHEN, H-Y.; WANG, W. W-J.; CHAOU, C-H.; LIN, C-C. Prognostic value of serial serum cholinesterase activities in organophosphate poisoned patients. **American Journal of Emergency Medicine**, v.27, p. 1034–1039, 2009.

CHOMEL, B. Tick-borne infections in dogs - An emerging infectious threat, **Veterinary Parasitology**, v.179, n. 4, p.294– 301, 2011.

COOP, R.L.; TAYLOR, M.A.; JACOBS, D.E.; JACKSON, F. Ectoparasites: recent advances in control, **TRENDS in Parasitology**, v.18, n.2, p. 55-56, 2002.

COUMAPHOS. JMPR, 1972. International Programme on Chemical Safety. Pesticide residues series 2. **INCHEM. Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v072pr11.htm>>

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; MARIA, M.; GENAR, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.149–155, 2005.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004, 579p.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p.173–185, 2008.

DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E.; MILLER, R.J. Efficacy of various concentrations of coumaphos to control adult, nymphal, and larval stages of an organophosphate-resistant strain of *Boophilus microplus* on infested cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.6, p.684-689, 2003.

- DECLEMENTI, C. 2007. Chapter 91 - Prevention and treatment of poisoning, p.1139-1158. In: GUPTA, R.C. (Ed.), **Veterinary Toxicology**. Elsevier Academic Press, San Diego.
- DELLINGER, J.; MOSTROM, M. Effects of topical fenthion on blood cholinesterase and vagal tone in dogs. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 30, n. 3, p.229–234, 1988.
- ENZO, O. Acute Poisoning From Food Contaminated by Coumaphos. **Wilderness and Environmental Medicine**, v.17, n.1, p.67-72, 2006.
- FERNANDES, E.K.K. ; ANGELO, I.C. ; RANGEL, D.E.N. ; BAHIENSE, T.C. ; MORAES, A.M.L. ; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P . An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307-318, 2011.
- FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 300-305, 2011.
- FLEMING, W.J. Recovery of Brain and Plasma Cholinesterase Activities in Ducklings Exposed to Organophosphorus Pesticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.10, p.215-229, 1981.
- FRITZ, C.L. Emerging Tick-borne Diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 2, p. 265–278, 2009.
- GARCIA, S.J.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. 2006. Interspecies Variation in Toxicity of Cholinesterase Inhibitors, p. 145-158. In: GUPTA, R.C.; ALVES, W.M.; SKOLNICK, B.E. **Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds**. Elsevier Academic Press, San Diego.
- GUPTA, R.C. 2006. Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates, p. 5-24. In: GUPTA, R.C.; ALVES, W.M.; SKOLNICK, B.E. **Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds**. Elsevier Academic Press, San Diego.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Ed Elsevier LTDA. 2006, 1115p.
- HILMAS, C.; ADLER, M.; BASKIN, S.I. 2006. Chapter 28 - Pulmonary Toxicity of Cholinesterase Inhibitors, p. 389-397. In: GUPTA, R.C.; ALVES, W.M.; SKOLNICK, B.E. **Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds**. Elsevier Academic Press, San Diego.
- HOVDA, L.R.; HOOSER, S.B. Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 455–467, 2002.
- HSIEH, B.H.; DENG, J.F.; GER, J.; TSAI, W.J. Acetylcholinesterase Inhibition and the Extrapyrmidal Syndrome: A Review of the Neurotoxicity of Organophosphate. **NeuroToxicology**, v.22, p.423-427, 2001.

ILG, T.; SCHMALZ, S.; WERR, M.; CRAMER, J. Acetylcholinesterases of the cat flea *Ctenocephalides felis*: identification of two distinct genes and biochemical characterization of recombinant and in vivo enzyme activities. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.40, p. 153-164, 2010.

JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v.166, p.139–160, 2001.

KAUFMAN, W.R. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.1, p. 11–22, 2010.

KENDALL, S.B. The Use of Organophosphorus Compounds in Veterinary Medicine. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v.54, n.5, p.406-408, 1961.

KERR, M.G. 2003. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. São Paulo: ROCA LTDA, 436p.

KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. 1992. **Current Veterinary Therapy XI: Small Animal Practice**. Ed. WB Saunders Company, 349p.

KNOLHOFF, L.M.; ONSTAD, D.W. 2007. Chapter 7 - Resistance by Ectoparasites, p. 125-151. In: Ibid. (Ed.), **Insect Resistance Management**. Academic Press, San Diego.

LANCASTER, J.L.; MEISCH, M.V. 1986. **Arthropods in livestock and poultry production**. Ellis Horwood Limited, England. 402p.

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo: Editora MZUSP/FAPESP, 2000, 291 p.

LITTLE, S.E.; HOSTETLER, J.; KOCAN, K.M. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. **Veterinary Parasitology**, v.150, p.139–145, 2007.

Manual Merck de Veterinária 9ª edição, Editora Roca, 2009, 2301 p.

MARABLE, B.R.; MAURISSEN, J.P.J.; MATTSSON, J.L.; BILLINGTON, R. Differential sensitivity of blood, peripheral, and central cholinesterases in beagle dogs following dietary exposure to chlorpyrifos. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 47, n. 3, p.240–248, 2007.

MARRS, T.; VALE, J.A. 2006. p.715-733. Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning. In: GUPTA, R.C.; ALVES, W.M.; SKOLNICK, B.E. **Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds**. Elsevier Academic Press, San Diego.

MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MATOLCSY, G. 1988. Anti-insect Agents. v. 32, p.21-239. In: Ibid. (Ed) **Studies in Environmental Science**. Elsevier Science Publishers, Budapest.

MELO, D. R. *Ação de Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre C. felis felis (Bouche, 1806) (Siphonaptera: Pulgicidade)*. 2006. 38 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ. 2006.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. 1995. **Medicina de Laboratório Veterinário: Interpretação e diagnóstico**. Ed. Roca. 320p.

OEHME, F.W.; MANNALA, S. 2001. Chapter 8 - Pesticide Use in Veterinary Medicine. v.1, p.263-274. In: KRIEGER, R.I. (Ed.), **Handbook of Pesticide Toxicology (Second Edition)**. Academic Press, San Diego.

PAZ, G.F.; RIBEIRO, M.F.; MICHALSKY, E.M.; DA ROCHA-LIMA, A.C.; FRANC, SILVA, J.C.; BARATA, R.A.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Evaluation of the vectorial capacity of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v.106, p.523–528, 2010.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GOLO, P.S.; QUINELATO, S.; CAMARGO, M.G.; SÁ, F.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 257-260, 2011.

POLLMEIER, M.; PENGO, G.; JEANNIN, P.; SOLL, M. Evaluation of the efficacy of fipronil formulations in the treatment and control of biting lice, Trichodectes canis (De Geer, 1778) on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 127–136, 2002.

POPE, C. 2001. Chapter 41 - The Influence of Age on Pesticide Toxicity. v.1, p.873-885. In: KRIEGER, R.I. (Ed.), **Handbook of Pesticide Toxicology (Second Edition)**. Academic Press, San Diego.

POPE, C.; KARANTH, S.; LIU, J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p.433–446, 2005.

Proceedings of the Royal Society of Medicine, v.54, n.5, p. 406–408, 1961.

RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p.115–121, 2007.

REY, L. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan. 2008, 950p.

ROCCO, L.C.M. **Guia prático para coleta e interpretação de exames laboratoriais em cães e gatos**. São Caetano do Sul, SP: Interbook, 2009.

ROSE, R.L.; HODGSON, E.; ROE, R.M. 1999. Chapter 28 – Pesticides, p.663-697. In: MARQUARDT, H.; SCHÄFER, S.G.; MCCLELLAN, R.O.; WELSCH, F. (Ed.), **Toxicology**. Academic Press, San Diego.

RUST, M.K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n.5, p. 232-236, 2005.

SACCARO, R.O. **Atividade da colinesterase sérica em cães antes e durante o uso de coleira impregnada com agente anticolinesterásico**. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007. Monografia. Especialização em Análises Clínicas Veterinária.

SANTOS, S. A Química dos Insecticidas (parte I). **Química**, v.85, p.43-47, 2002.

SCOTT, F. B.; MARTINS, I. V. F.; SOUZA, C. P.; CORREIA, T. R. Aspectos gerais do controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* em cães. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 13-18, 2002.

SHARMA, R.P. 2006. Chapter 35 - Organophosphates, Carbamates, and the Immune System, p.495-507. In: GUPTA, R.C.; ALVES, W.M.; SKOLNICK, B.E. **Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds**. Elsevier Academic Press, San Diego.

SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J.; BREITSCHWERDT, E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v.17, n.2, p. 74-80, 2001.

SHELTON, G.D. Myasthenia Gravis and Disorders of Neuromuscular Transmission. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.32, n.1, p.189-206, 2002.

SILVEIRA, J.A.G.; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (LATRIELLE, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.161, n. 3-4, p.270-275, 2009.

SOBRINHO, R.N.; SILVA, M.C.L.; LINHARES, G.F.C. Avaliação antiixodídica de Diazinon, Coumafós e Cipermetrina, através de testes in vitro sobre fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) na bacia leiteira da microrregião de Goiânia-Goiás, **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v.27, n.2, p. 13-19, 1997.

SONENSHINE, D.E.; LANE, R.S.; NICHOLSON, W.L. 2002. Chapter 24 - Ticks (Ixodida), p. 517-558. In: **Medical and Veterinary Entomology**, Elsevier Science.

STARKS, S.E.; GERR, F.; KAMEL, F.; LYNCH, C.F.; JONES, M.P.; ALAVANJA, M.C.; SANDLER, D.P.; HOPPIN, J.A. Neurobehavioral function and organophosphate insecticide use among pesticide applicators in the Agricultural Health Study. **Neurotoxicology and Teratology**, (2011). doi: 10.1016/j.ntt.2011.08.014

TAYLOR, M. A. Recent Developments in Ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253-268, 2001.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Veterinary Parasitology**. 3^a ed. Iowa: Blackwell Publishing. 2007, 874p.

TECLES, F.; CERÓN, J.J. Determination of whole blood cholinesterase in different animal species using specific substrates. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.233-238, 2001.

TECLES, F.; MARTÍNEZ SUBIELA, S.; BERNAL, L.J.; CERÓN, J.J. Use of Whole Blood for Spectrophotometric Determination of Cholinesterase Activity in Dogs. **The Veterinary Journal**, v. 160, n. 3, p. 242-249, 2000.

THRALL, M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária** 1ª ed. São Paulo: Ed. ROCA LTDA. 2007, 582p.

THIERMANN, H.; STEINRITZ, D.; WOREKA, F.; RADTKE, M.; EYER, P.; EYER, F.; FELGENHAUER, N.; ZILKER, T. Atropine maintenance dosage in patients with severe organophosphate pesticide poisoning. **Toxicology Letters**, v.206, p.77– 83, 2011.

UNGER, T.A. 1996. **Pesticide Synthesis Handbook**. New Jersey: Noyes Publications, 1080p.

WALL, R. Ectoparasites: Future challenges in a changing world, **Veterinary Parasitology**, v.148, n. 1, p.62–74, 2007.

WILSON, B.W. 2001. Chapter 48 – Cholinesterases. v.2, p.967-985. In: KRIEGER, R.I. (Ed.), **Handbook of Pesticide Toxicology (Second Edition)**. Academic Press, San Diego.

ANEXO

Anexo A. Quadro 3. Valores de referência para parâmetros de exame clínico, exame hematológico e bioquímico para cães.

Parâmetro	Valores		Referência
	Mínimo	Máximo	
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,5	8,5	Bush (2004)
Hemoglobina (g/dL)	12,0	18,0	Bush (2004)
Hematócrito (%)	37	55	Bush (2004)
VCM (fentolitros)	60	77	Bush (2004)
CHCM (g/dL)	32	36	Bush (2004)
HCM (pg)	19,5	24,5	Bush (2004)
Leucócitos ($\times 10^3$ cels/ μL)	6,0	17,0	Bush (2004)
Mielócitos (cels/ μL)	0	0	Bush (2004)
Metamielócitos (cels/ μL)	0	0	Bush (2004)
Bastões (cels/ μL)	0	300	Bush (2004)
Segmentados (cels/ μL)	3000	11500	Bush (2004)
Linfócitos (cels/ μL)	1000	4800	Bush (2004)
Monócitos (cels/ μL)	150	1350	Bush (2004)
Eosinófilos (cels/ μL)	100	1250	Bush (2004)
Basófilos (cels/ μL)	raros	Raros	Bush (2004)
Plaquetas (cels/ μL)	145000	440000	Kirk e Bonagura (1992)
Proteína (g/dL)	6,0	7,8	Meyer, Coles e Rich (1995)
ALT (U/L)	10,0	88,0	Meyer, Coles e Rich (1995)
AST (U/L)	10,0	88,0	Meyer, Coles e Rich (1995)
GGT (U/L)	1,0	10,0	Meyer, Coles e Rich (1995)
Fosfatase Alcalina (U/L)	20,0	150,0	Meyer, Coles e Rich (1995)
Uréia (mg/dL)	15,0	40,0	Bush (2004)
Creatinina (mg/dL)	0,5	1,5	Bush (2004)
Acetilcolinesterase	2000	5000	Abdelkader; Hauge (1986)
Frequência Respiratória (mov/min)	18	34	Manual Merck (2009)
Frequência Cardíaca (bat/min)	70	120	Manual Merck (2009)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	38,4	39,4	Manual Merck (2009)

Anexo B. FICHA DE EXAME CLÍNICO DETALHADO

Animal nº _____ Sexo () M () F Grupo _____ Dia experimental _____

OCULAR			MUSCULAR			RESPIRATÓRIO		
Opacidade	S	N	Tremores de membros anteriores.	S	N	Dispnéia	S	N
Nistagmo	S	N	Tremores de membros posteriores	S	N	Sons respiratórios	A	N
Alteração pupilar	S	N	Tremores generalizados	S	N	Secreção nasal	S	N
Blefaroespasm	S	N	Lábio caído	S	N	Apnéia	S	N
Cegueira	S	N	Paralisia	S	N			
Protusão de 3ª pálpebra	S	N	Atonia	S	N			
Irite	S	N	Atrofia	S	N			
Quemose	S	N				NEUROLÓGICO/COMPORAMENTAL		
Fotofobia	S	N	TEGUMENTAR			Ansioso	S	N
Congestão	S	N	Alopecia	S	N	Apreensivo	S	N
Reflexo palpebral	S	N	Pêlo	A	N	Andar em círculos	S	N
Conjuntivite	S	N	Hidratação	A	N	Comatose	S	N
Secreção lacrimal	S	N	Prurido	S	N	Deprimido	S	N
			Dermatite	S	N	Decúbito dorso ventral	S	N
CAVIDADE ORAL			Leve			Decúbito lateral	S	N
Dor	S	N	Moderada			Decúbito lateral e pedalar	S	N
Inchaço	S	N	Intensa			Sedado	S	N
Inflamação	S	N	Sensibilidade à palpação	S	N	Prostrado	S	N
Necrose	S	N				Nariz e lábios edemaciados	S	N
Sialorréia	S	N	GASTROINTESTINAL			Meneios de cabeça	S	N
	S	N	Consistência das fezes	A	N	Forçando a cabeça contra objetos	S	N
			Diarréia	S	N	Protusão lingual	S	N
LINFÁTICO			Cólica	S	N	Convulsões	S	N
Linfonodos (palpação)	A	N	Colica e rolagem	S	N	Desequilíbrio de membros anteriores	S	N
			Músculos abdominais tensos	S	N	Desequilíbrio de membros posteriores	S	N
			Sangue nas fezes	S	N	Desequilíbrio em estação	S	N
APETITE/SAUDE GERAL			Auscultação	A	N	Desequilíbrio em marcha	S	N
Consumo alimento	A	N				Incoordenação de membros anteriores	S	N
Consumo de água	A	N	CARDIOVASCULAR			Incoordenação de membros posteriores	S	N
Condição corporal	A	N	FC	A	N	Ataxia ou paresia de membros anteriores	S	N
Hidratação	A	N	Coloração de mucosas	A	N	Ataxia ou paresia de membros posteriores	S	N
			Auscultação (sons cardíacos)	A	N	Reflexos anormais	S	N
URINÁRIO/REPRODUTIVO								
Sensibilidade à palpação	A	N						
Urina	A	N						

S	N	S= Sim ; N = Não
A	N	A = Anormal, N = Normal

Observações:
