

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ERITROLEUCOMETRIA, BIOQUÍMICA PLASMÁTICA E
SÉRICA E HISTOPATOLOGIA DE POMBAS (*Zenaida
auriculata*) SUBMETIDAS À INTOXICAÇÃO
EXPERIMENTAL COM METAMIDOFÓS – VALIDADE DA
ESPÉCIE COMO INDICADOR DE QUALIDADE AMBIENTAL**

Fabiano Borba Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Célio Raimundo Machado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária – área de concentração em Patologia Animal.

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
2006

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FABIANO BORBA GUIMARÃES – Nascido na cidade de Brasília – DF, em 9 de maio de 1980, portador do RG nº113905344-9, MEX-DF. Médico Veterinário graduado pela Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV - da Universidade de Brasília – UnB, colou grau em 18 de fevereiro de 2003, estando inscrito no Conselho Regional de Medicina Veterinária sob o CFMV N° 1240. Após sua graduação, trabalhou no projeto GADONÇA, financiado pela ONG Pró-Carnívoros. Ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Jaboticabal, área de concentração de Patologia Animal, em março de 2003.

DEDICATÓRIA

Aos dois anjos que me trouxeram ao mundo e que me deram amor e apoio incondicional, eu os chamo Papai e Mamãe, vocês podem dizer Cleber e Neyde.

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação assemelha-se ao trabalho duro de uma banda, onde quem mais aparece é o vocalista, ofuscando a imagem dos outros músicos e até dos compositores que foram, do mesmo modo, autores que a levaram ao sucesso. Na banda dessa dissertação, agradeço aos seguintes participantes:

Ao Professor Doutor Célio Raimundo Machado, por ter me dado a oportunidade de fazer pós-graduação na tão afamada UNESP.

À minha banca de qualificação, Professor Doutor Antônio de Queiroz Neto e José Jurandir Fagliari, que me auxiliaram a amadurecer minha dissertação com suas críticas construtivas.

A minha banca de defesa de dissertação, Professor Doutor Áureo Evangelista Santana e Professora Doutora Glenda Ramalho Barbudo, que deram as lapidações finais para que o trabalho mostrasse o seu melhor.

À Professora Doutora Karin Werther, que sempre abriu as portas de sua sala para dividir comigo sua bagagem acadêmica.

Às funcionárias da biblioteca, especialmente à Tieko, por serem tão prestativas.

Às entidades financiadoras de bolsas de estudos CAPES e CNPq, que me permitiram fazer uma pós-graduação com dignidade.

À minha irmãzinha, Macaca, e meus sobrinhos – Animal, Bárbara e Vegetal – que me trouxeram apoio e alegria durante o período distante da minha cidade natal.

Ao meu irmão, Filipe, que sempre se lembra do caçula com seu jeito estabonado.

À Isabel, que me auxiliou com seu conhecimento, boas idéias e elucidaciones durante o trabalho.

À amiga Cecília, que me amparou com seus conhecimentos profundos a respeito da língua inglesa.

Ao estagiário Waguinho, que me ajudou em quase todas as etapas do experimento.

Ao funcionário Eugênio e a funcionária Renata, que me auxiliaram e tutelaram com muita paciência.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Preventiva, em especial ao Badeco e Antônio, sem eles teria sido impossível capturar os animais utilizados.

Aos meus amigos Ricarda e Salsicha, que com tanto zelo me auxiliaram a tratar dos animais nos momentos em que não podia estar presente. Ricarda, obrigado por fazer a estatística ficar inteligível e os gráficos apresentáveis.

À amiga e estagiária Giane, que me auxiliou com a dura limpeza das instalações e gaiolas.

Aos amigos da República “Ou Não”, Consolo, Durva e especialmente a Malu, que além de amiga foi professora nas artes laboratoriais.

À amiga Tau, por ter me aprimorado nas técnicas de necrópsia e por ter me auxiliado em todas as coletas.

Ao meu amigo e professor André e a Célia, sua esposa, que abriram meus olhos para ver as outras portas da vida.

À amiga e professora Beth, peça chave na elaboração do projeto da dissertação.

Aos amigos da República “Entrometheu”, em especial ao Bernento, Pistolinha e Tumor, que me socorreram com computadores problemáticos, planilhas de dados e outros pormenores, que no calor da prova se tornaram “pormenores”, além de aturar meus usos e abusos de seus computadores até de madrugada.

Aos amigos do peito, lado esquerdo, Wanessa, Simone, Sabrina de Recife, Viúva, Garrott, Maria Fernanda, Anderson, Mariah, Feio, Luciana, Chocolate, Jandira, Gaby e Glenda – vocês tornam minha vida muito mais graciosa. Os amigos não citados que me perdoem: o papel não aceita tantos nomes quanto o coração.

À minha cadela Filó e meus outros cachorros por tabela – Brutus e Eva: adoro o jeito como vocês abanam o rabo quando o mundo está desmoronando.

À minha namorada Ana Lúcia, que adoça os amargores da vida com sua presença. Obrigado por me ter feito redescobrir meus sonhos.

Às pombas que deixaram de arrulhar no céu, aumentando o conhecimento humano na Terra.

Que todos os citados neste documento continuem lançando canções em minha vida.

SUMÁRIO

	Página
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1.AÇÃO DOS ORGANOFOSFORADOS.....	3
2.2.INFORMAÇÕES SOBRE O METAMIDOFÓS.....	3
2.3.EFEITO GERAL DA INTOXICAÇÃO EM AVES.....	4
2.4 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICO-SÉRICAS DECORRENTES DA INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS.....	6
2.5.ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS RELACIONADAS AO USO DE INIBIDORES DA COLINESTERASE.....	10
3.OBJETIVOS.....	14
3.1.GERAL.....	14
3.2.ESPECÍFICOS.....	14
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1.LOCAL DO EXPERIMENTO.....	15
4.2.ANIMAIS UTILIZADOS.....	15
4.3.INTOXICAÇÃO, ROTINA DE COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO, QUARENTENA E EXAME CLÍNICO DAS AVES.....	15
4.4.GRUPO CONTROLE.....	17
4.5.EXAMES HEMATOLÓGICOS.....	17
4.6.OBTENÇÃO DO SORO.....	18
4.7.MENSURAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA.....	18
4.8.DOSAGEM DE LIPÍDIOS.....	19
4.9.ATIVIDADE DE TRANSAMINASES.....	19

4.10. PROVAS DE FUNCIONALIDADE RENAL.....	19
4.11. COSCIENTE DO PESO DO FÍGADO/PESO CORPORAL (ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO –IHS).....	20
4.12. VALORES BIOMÉTRICOS.....	20
4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5. RESULTADOS.....	22
5.1. HEMOGRAMA E ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS.....	21
5.2. BIOQUÍMICA SÉRICA.....	26
5.3. ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS OBSERVADAS AO EXAME NECROSCÓPICO.....	28
5.4. ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS OBSERVADAS AO EXAME HISTOLÓGICO.....	29
6. DISCUSSÃO.....	34
6.1. HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA.....	34
6.2. ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS.....	36
6.3. ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS.....	37
7. CONCLUSÕES.....	38
8. BIBLIOGRAFIA.....	39

LISTA DE TABELAS

	Página
<p><u>Tabela 1.</u> Parâmetros hematológicos da série vermelha, série branca, índices hematimétricos e índice hepatossomático de aves controle e intoxicadas. Os valores indicam as médias \pm os erros padrões da média. O ensaio dos controle foi realizado em 06/07/2005 e dos intoxicados nos dias 02/08/2005 (T1), 04/08/2005 (T2), 07/08/2005 (T3), 10/08/2005 (T4), 13/08/2005 (T5), 16/08/2005 (T6), 19/08/2005 (T7) e 22/08/2005 (T8), no Departamento de Patologia Animal, exceto a hemoglobina, que foi mensurada no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, ambos departamentos da UNESP, Campus de Jaboticabal.</p>	25
<p><u>Tabela 2.</u> Parâmetros bioquímico-séricos e plasmáticos de aves controle e intoxicadas. Os valores indicam as médias \pm os erros padrões da média. Os ensaios foram realizados no dia 05/10/2005 e 06/10/2005, no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP, Campus de Jaboticabal.</p>	27

LISTA DE FIGURAS

Páginas

- Figura 1. Representação gráfica da variação do número de hemácias/ μL . Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) $n=8$, e em cada T (tempo) $n=2$, totalizando 16 intoxicados. A leitura dos controle foi realizada em 06/07/2005 e dos intoxicados nos dias 02/08/2005 (T1), 04/08/2005 (T2), 07/08/2005 (T3), 10/08/2005 (T4), 13/08/2005 (T5), 16/08/2005 (T6), 19/08/2005 (T7) e 22/08/2005 (T8), no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal. 21
- Figura 2. Representação gráfica da variação da concentração de hemoglobina. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) $n=8$, e em cada T (tempo) $n=2$, totalizando 16 intoxicados. O ensaio dos controle foi realizado em 06/07/2005 e dos intoxicados nos dias 02/08/2005 (T1), 04/08/2005 (T2), 07/08/2005 (T3), 10/08/2005 (T4), 13/08/2005 (T5), 16/08/2005 (T6), 19/08/2005 (T7) e 22/08/2005 (T8), no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP, Campus de Jaboticabal. 22
- Figura 3. Representação gráfica da variação do número de leucócitos/ μL . Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) $n=8$, e em cada T (tempo) $n=2$, totalizando 16 intoxicados. A leitura dos controle foi realizada em 06/07/2005 e dos intoxicados nos dias 02/08/2005 (T1), 04/08/2005 (T2), 07/08/2005 (T3), 10/08/2005 (T4), 13/08/2005 (T5), 16/08/2005 (T6), 22/08/2005 (T7) e 22/08/2005 (T8), no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP, Campus de Jaboticabal. 22

19/08/2005 (T7) e 22/08/2005 (T8), no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.

Figura 4 Representação gráfica da variação do número de eosinófilos/ μL . Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) $n=8$, e em cada T (tempo) $n=2$, totalizando 16 intoxicados. As leituras foram realizadas nos dias 04/09/2005 e 05/09/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, campus de Jaboticabal.

23

Figura 5. Representação gráfica da variação do número total de heterófilos/ μL . Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) $n=8$, e em cada T (tempo) $n=2$, totalizando 16 intoxicados. As leituras foram realizadas nos dias 04/09/2005 e 05/09/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, campus de Jaboticabal.

23

Figura 6. Representação gráfica das médias de uréia. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) $n=8$, e em cada T (tempo) $n=2$, totalizando 16 intoxicados. O ensaio foi realizado no dia 05/10/2005 e 06/10/2005, no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP, Campus de Jaboticabal.

25

LISTA DE QUADROS

	Página
<u>Quadro 1.</u> Alterações macroscópicas observadas às necropsias dos animais controle realizadas em 06/07/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.	28
<u>Quadro 2.</u> Alterações macroscópicas observadas às necropsias dos animais intoxicados, realizadas nos dias 02/08/2005 (1 e 2), 04/08/2005 (3 e 4), 07/08/2005 (5 e 6), 10/08/2005 (7 e 8), 13/08/2005 (9 e 10), 16/08/2005 (11 e 12), 19/08/2005 (13 e 14) e 22/08/2005 (15 e 16), no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.	29
<u>Quadro 3.</u> Descrição das lesões histológicas observadas no fígado dos animais controle. As leituras foram realizadas no dia 04/12/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.	29
<u>Quadro 4.</u> Descrição das lesões histológicas observadas no fígado dos animais intoxicados. As leituras foram realizadas no dia 04/12/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.	29
<u>Quadro 5.</u> Descrição das lesões histológicas observadas nos rins dos animais controle. As leituras foram realizadas no dia 04/12/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.	30
<u>Quadro 6.</u> Descrição das lesões histológicas observadas nos rins dos animais intoxicados. As leituras foram realizadas no dia 02/12/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.	31

**ERITROLEUCOMETRIA, BIOQUÍMICA PLASMÁTICA E SÉRICA E
HISTOPATOLOGIA DE POMBAS (*Zenaida auriculata*) SUBMETIDAS À
INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM METAMIDOFÓS – VALIDADE DA ESPÉCIE
COMO INDICADOR DE QUALIDADE AMBIENTAL.**

RESUMO

As aves, especialmente as sedentárias, têm sido utilizadas para a avaliação da qualidade do meio ambiente onde estão fixadas, mostrando-se valiosos bioindicadores. A pomba amargosa, *Zenaida auriculata*, pode ter uma promissora utilidade por espoliar lavouras onde sabidamente são utilizados diversos defensivos agrícolas, dentre eles os organofosforados. No entanto, dados a respeito do dano ocasionado na referida espécie de ave com organofosforados não se encontram disponíveis na literatura. Este estudo objetivou verificar a viabilidade do uso da pomba amargosa, *Zenaida auriculata*, como bioindicador de qualidade ambiental pela análise dos dados de eritroleucometria, bioquímica sérica e histopatologia. Para tanto, comparou-se dois grupos, um com 16 animais, intoxicado com metamidofós na dose de 8 mg/kg por via oral, e outro controle, com 8 animais, que recebeu apenas o veículo (salina). Todos os animais eram de vida livre e foram capturados no perímetro urbano da cidade de Jaboticabal, São Paulo. Os animais controle foram sacrificados todos no mesmo dia, e seus dados foram utilizados como padrão de normalidade. Os intoxicados foram acompanhados durante 21 dias, e divididos em 8 grupos com duas aves cada, o primeiro sendo sacrificado 12 horas após a intoxicação e os demais a cada 3 dias. Dentre os parâmetros avaliados, observou-se alteração nos valores de uréia (aumentada em T1 - $17,28 \pm 0$ mg/dL e T5 - $13,825 \pm 0,86$ mg/dL), número de eritrócitos (diminuído em T2 - $2,04 \pm 0,35$ hemácias/ $\mu\text{L} \times 10^6$), hemoglobina (aumentada em T5 - $12,3 \pm 0,1$ g/dL, T6 - $9,4 \pm 0,2$ g/dL e T8 - $10,75 \pm 1,25$ g/dL) leucócitos (aumentado em T1 22900 ± 3500 céls/ μL , T2 10700 ± 2300 céls/ μL , T5 13700 ± 100 céls/ μL e T8 10100 ± 300 céls/ μL) eosinófilos (diminuído em T7 - 88 ± 0 / μL) e heterófilos (aumentado em T1 18202 ± 2390 / μL , T2 6946 ± 562 / μL e T8 6403 ± 163 / μL). Os dados constatados ou a relação entre estes mostraram que a *Zenaida auriculata* não é um modelo biológico válido para indicar a presença de organofosforados no ambiente

Palavras chave: *Zenaida auriculata*, metamidofós, bioindicadores, sangue, bioquímica sérica.

**ERITROLEUCOMETRY, SERIC AND PLASMA BIOCHEMISTRY AND
HISTOPATHOLOGY OF DOVES (*Zenaida auriculata*) SUBMITTED TO INTOXICATION
WITH METAMIDOPHOS – FEASIBILITY OF THE ESPECIE AS INDICATOR OF
ENVIROMENTAL QUALITY.**

SUMMARY

Birds, especially the sedentary ones, have been used to evaluate the quality of the environment where they belong, proving to be valuable bioindicators. The Eared Dove, *Zenaida auriculata*, can have a promising utility since it spoils farmings where several agriculture defensives are used, such as the organophosphate compounds. However, there are no data available in the literature about the damage caused by this sort of chemical product. The goal of this study was to examine the feasibility of using the Eared Dove, *Zenaida auriculata*, as a bioindicator of environmental quality by the analysis of the data on erythroleucometry, seric biochemistry and histopathology. Therefore, two groups were compared, one having 16 animals, and orally intoxicated with methamidophos in 8mg/kg. Another group, with 8 animals, received only the vehicle (saline). All the animals were free and were captured in the city of Jaboticabal, in Sao Paulo State. All the control animals were sacrificed in the same date and their data were used as a normality pattern. The intoxicated ones were observed for 21 days and spread in 8 groups of two birds each. The first one was sacrificed 12 hours after the intoxication and the rest of them every 3 days. Within the evaluated patterns the following changes were observed: urea (increased in T1 - $17,28 \pm 0$ mg/dL and T5 - $13,825 \pm 0,86$ mg/dL), number of erythrocytes (decreased in T2 - 2.04 ± 0.35 erythrocytes/ $\mu\text{L} \times 10^6$), hemoglobin (increased in T5 - 12.3 ± 0.1 g/dL, T6 - 9.4 ± 0.2 g/dL and T8 - 10.75 ± 1.25 g/dL), leukocytes (increased in T1 22900 ± 3500 cells/ μL , T2 10700 ± 2300 cells/ μL , T5 13700 ± 100 cells/ μL and T8 10100 ± 300 cells/ μL), eosinophils (decreased in T7 - 88 ± 0 / μL) and heterophils (increased in T1 18202 ± 2390 / μL , T2 6946 ± 562 / μL and T8 6403 ± 163 / μL). The data obtained and the relations between them showed that *Zenaida auriculata* is not a valid biological model for indicating the presence of organophosphate compounds in the environment.

Key words: *Zenaida auriculata*, methamidophos, bioindicators, blood, seric biochemistry.

1. INTRODUÇÃO

Os organofosforados são compostos anticolinesterásicos com variado grau de toxicidade para o ser humano e vêm sendo utilizados como inseticidas, fungicidas e parasiticidas na agricultura desde a Segunda Guerra Mundial (ECOBICHON, 1996). Juntamente com os organoclorados, são os inseticidas mais comuns na agricultura e ambientes domésticos. Além disso, outros usos para os inibidores da colinesterase são conhecidos e relacionados até mesmo à saúde pública, como o controle de vetores da dengue e da malária (NAMBA et al., 1971; CARLTON et al., 1998).

Existem, atualmente, mais de 200 organofosforados diferentes sendo comercializados (ECHOBICHON, 1996), sendo a principal classe de praguicidas utilizada no mundo (SAADEH et al., 1996; CARLTON et al., 1998). A toxicidade destes produtos é variável, os mais tóxicos correspondendo àqueles usados na agricultura e nos armamentos químicos, os de toxicidade intermediária, correspondendo àqueles usados contra pragas animais, e os de baixa toxicidade, largamente comercializados para o uso doméstico (CARLTON et al., 1998).

Muito utilizado na cultura de soja e outros grãos, o metamidofós (O, S-dimetil fosforamidotioato) é um organofosforado que atua inibindo a ação da enzima colinesterase, sendo o principal metabólito do acefato. É sabido que este deixa resíduos nas culturas onde é utilizado, e o nível máximo permitido é de apenas 0,05 mg/kg para os grãos de soja (MATTOCK, 2003).

A *Zenaida auriculata* e outras aves, devido a seus hábitos alimentares, entram em contato direto com os defensivos agrícolas, entre eles o metamidofós, mas dados sobre o impacto dos organofosforados sobre o metabolismo e hematologia desses animais não existem. Além disso, as diversas espécies de pássaros, especialmente as sedentárias como o pombo doméstico (*Columba livia*), têm sido utilizadas para a verificação da qualidade do

meio ambiente em que estão inseridas (NENTWICH e PAULUS, 1999). Neste contexto, as aves podem ser valiosos bioindicadores, auxiliando as autoridades no monitoramento dos níveis de contaminação por diversas substâncias (NAGEL et al., 2001). Algumas espécies como *Pica pica*, *Passer domesticus*, *Passer montanus*, *Turdus merula* e *Accipiter gentilis* são reconhecidas como indicadores de qualidade ambiental no continente europeu (DMOWSKI, 1999).

A pomba amargosa, *Zenaida auriculata*, é uma espécie daninha, causando danos significativos à agricultura em diversos países sul-americanos (RODRIGUES, 1983; DONATELI, 2000). Costuma nidificar em plantações de cana-de-açúcar, possuindo poucos predadores nesses ambientes, o que favorece grandes concentrações de populações no sudoeste do estado de São Paulo (DONATELLI, 2000). As lavouras mais espoliadas são as de milho, trigo, arroz e soja, também existindo registros de prejuízos em culturas de sorgo e girassol (RANVAUD et al., 2001). O prejuízo causado na soja passa de 30% das plântulas cultivadas, dado comparável ao dano causado por outras pragas de importância econômica combatidas com aspersão de veneno (OKAWA et al., 2001).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AÇÃO DOS ORGANOFOSFORADOS

Os organofosforados inibem a colinesterase por meio de ligação covalente (fosforilação) com o grupo hidroxil da serina presente no sítio esterásico da enzima, podendo se ligar a ambos os sítios ativos da substância. Os efeitos farmacológicos dos anticolinesterásicos resultam do acúmulo de acetilcolina, estimulando tanto receptores colinérgicos muscarínicos como nicotínicos (SPINOSA et al., 1999), podendo ser absorvidos por via oral, respiratória e cutânea (CARLTON et al., 1998).

2.2. INFORMAÇÕES SOBRE O METAMIDOFÓS

O metamidofós é um organofosforado resultante da clivagem do acefato (ANÔNIMO, 1990; ANTONIOUS e ZINDER, 1994) e é classificado como um produto Classe I, tendo obrigatoriamente as palavras “Perigo-Veneno” nos rótulos dos produtos comerciais, ou seja, é um praguicida de uso restrito e a tolerância a seus resíduos nos produtos agrícolas crus varia de 0,5 a 1,0 ppm, mas essa classificação pode variar com a localidade (MEISTER, 1995). Seus nomes comerciais são Monitor, Nitofol, Tamaron, Swipe, Nuratron, Vetaron, Filitrox, Patrole, Tamanox, SRA 5172 e TAM (KIDD e JAMES, 1994; MEISTER, 1995),

Trata-se de um potente inseticida, acaricida ou mesmo avicida, com atividade sistêmica e residual no meio ambiente, sendo um forte inibidor da acetilcolinesterase (HUSSAIN, 1987). É altamente tóxico para aves (KIDD e JAMES, 1994) e peixes (KIDD e JAMES, 1994; MEISTER, 1995).

Em humanos, os sintomas de intoxicação aguda pelo metamidofós dependem da via de exposição e geralmente se desenvolvem no máximo 12 horas posteriormente ao contato. Quando inalado, os sintomas incluem: dificuldade respiratória com sibilos, cefaléia, visão turva, pupilas dilatadas, lacrimejamento e coriza. Se ingerido, observam-se náuseas, vômitos, diarreia e câibras. A absorção pela pele gera sudorese e contrações musculares no local onde houve contato (MORGAN, 1989).

Em todos os casos de absorção significativa, independentemente da via de exposição, ocorre fraqueza, ataxia, visão turva, dificuldade respiratória, sudorese, confusão, mudanças na frequência cardíaca, convulsões, coma e parada respiratória (MORGAN, 1989). Apesar de existir inibição da colinesterase utilizando-se doses relativamente baixas, não se constatou danos mensuráveis aos organismos com a ingestão diária de subdoses do produto (ANÔNIMO, 1990). No entanto, pequenas doses foram suficientes para diminuir a fertilidade de ratos expostos ao Tameron® (JUAREZ e SANCHES, 1989)*.

Quanto ao seu poder teratogênico, sabe-se que é capaz de gerar alterações patológicas nos fetos de coelhos e diminuição do peso das reprodutoras e das crias (JUAREZ e SANCHES, 1989).

2.3. EFEITO GERAL DA INTOXICAÇÃO EM AVES

A susceptibilidade à intoxicação por organofosforados, em aves, depende da idade, da espécie, da dose e do princípio ativo (WOLFE e KENDAL, 1998). Algumas espécies, como o faisão de anel (*Phasianus colchicus*), mostraram-se susceptíveis a esse tipo de intoxicação, especialmente quando filhotes (GROVE et al., 1998). É provável que o aumento da ação da colinesterase no adulto propicie maior resistência (WOLFE e KENDAL, 1998). Além disso,

* Produzido pelo laboratório Bayer S/A.

baixas temperaturas diminuem a velocidade da recuperação, além de potencializar quadros hipotérmicos (BRUNET e McDUFF, 1997).

O metabolismo e eliminação desses agentes são relativamente rápidos, sem evidências de ocorrência de bioacumulação (BARON, 1991). A excreção ocorre principalmente pela urina e fezes, e, secundariamente, pela via biliar; ocorrendo, nestes casos, circulação entero-hepática, prolongando a sintomatologia (LARINI, 1993). No entanto, pode ocorrer inibição acumulativa da enzima acetilcolinesterase através da exposição repetida e/ou prolongada (MACHEMER e PICKEL, 1994).

Os sinais clínicos na fauna aviária estão relacionados à neurotoxicidade, com ataxia, paresia e paralisia (RESANOVICK et al., 1996). Outros sintomas também podem ocorrer como hipotermia, diminuição no consumo de alimentos e perda de peso, menores taxas reprodutivas, depressão, comportamentos anormais e mesmo hiperatividade. Não se sabe o que essas alterações etológicas podem determinar na ecologia das espécies. Estudos demonstram que a capacidade de evitar predadores também se encontra diminuída nos animais submetidos a doses subletais dos organofosforados, assim como a habilidade migratória, o canto, a proteção e altura que o ninho é colocado, levando até mesmo ao abandono do ninho nas exposições crônicas (PARSONS et al., 2005).

A perda de peso pode ser devida à anorexia causada pelos praguicidas, pela repulsa à comida contaminada ou mesmo pela diminuição da habilidade de procurar comida, já que os inibidores da colinesterase podem afetar a visão, o aprendizado e a memória. A diminuição na oviposição também pode ser um efeito direto da redução do consumo de alimento e das alterações nos níveis hormonais causados por estas substâncias (PARSONS et al., 2005).

Em condições experimentais, um estudo conduzido com *Agelaius phoeniceus* revelou que a intoxicação se iniciava com a observação de ataxia, piloereção e desidratação devido à diarreia. Com o aumento da dose, iniciavam-se as disfunções neuromusculares e

complicações respiratórias, culminando com paralisia muscular e morte dos animais. O dano causado ao comportamento é muito intenso, pois pequenas doses podem afetar a atividade das aves por alguns dias (BRUNET et al., 1997). Paradoxalmente, alguns autores só observaram sinais de neuropatia após o aparecimento evidente de sintomas de intoxicação colinérgica (JOKANOVIC, 1993; JOKANOVIC et al., 1995).

A avifauna é especialmente sensível ao contato com este tipo de agente, e alguns relatos de intoxicações com óbitos já foram feitos após o uso dos organofosforados como praguicidas (ZINKL et al., 1981; ALEXANDER., 1983; RAINWATER et al., 1995). O uso abusivo desses compostos é uma preocupante causa de danos à saúde das populações aviárias, mesmo que o uso seja controlado por prescrição agrônômica (MINEAU-PIERRE et al., 1999).

Os fatores que predis põem as aves a um maior contato com inibidores da colinesterase são: insetivoria e vermivoria; comportamento predatório oportunista de animais debilitados; alimentar-se de presas mortas – especialmente do trato gastrintestinal; a presença em áreas agrícolas - muitas vezes utilizando a lavoura como alimento; o *status* de espécie praga e o hábito de andar em bandos (MINEAU-PIERRE et al., 1999). A diminuição do estoque das populações de insetos e outras presas causadas por estes agentes também podem vir a contribuir indiretamente para a mortandade animal, especialmente de jovens (GROVE et al., 1998).

2.4. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICO-SÉRICAS DECORRENTES DA INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS

Sharma et al. (1998) constataram diminuição da contagem global de eritrócitos, do volume globular (VG) e da taxa de hemoglobina utilizando o inibidor da colinesterase furadan

SP50 em *Columba livia*, a pomba doméstica. Mandal e Lahiri (1985) obtiveram resultados parecidos pelo uso de fenitrothion, além do aumento no tempo de coagulação.

Justificando tais achados, Sharma et al., (1998) teorizaram que o organofosforado poderia agir diretamente sobre a medula, ou, de forma indireta, reduzir os níveis de catecolaminas plasmáticas, o que diminuiria as concentrações de eritropoietina. Outra forma de ação direta seria a lise dos eritrócitos pelo agente, o que justificaria a diminuição do VG. Gromysz-kalkowska e Szubartowska (1993) justificaram a depressão ocorrida no VG pela possível redução no tamanho dos eritrócitos, pois a diminuição na célula minimizaria a área de exposição da membrana ao agente. No entanto, Sharma e Saxena (1997) não observaram redução no VG, mas outros parâmetros, como as concentrações de hemoglobina e número de eritrócitos, seguiram o mesmo padrão acima.

A lesão direta à parede vascular contribuiu, como se constatou em rãs (*Rana temporaria*), para a redução no número de eritrócitos e os mecanismos compensatórios de diluição promovidos pelos fluidos teciduais após hemorragia vascular diluíram as hemácias e a hemoglobina no sangue (GROMYSZ-KALKOWSKA e SZUBARTOWSKA, 1993). Neste experimento, Gromysz-kalkowska e Szubartowska (1993) relataram um aumento no número de reticulócitos e eritroblastos, uma resposta positiva do organismo frente ao dano causado pelo organofosforado quando a intoxicação se dá em pequenas doses.

Paradoxalmente, Guilhermino et al., (1998) conduziram um estudo com ratos machos adultos e concluíram que houve aumento gradual na contagem total de hemácias, taxa de hemoglobina e hematócrito, com diminuição significativa do número de plaquetas, à medida que aumentaram as doses de parathion, o que pode ser condizente com um estado de desidratação ocasionado pelo inibidor da colinesterase.

Com relação ao número de leucócitos, Sharma et al., (1998) relataram um aumento da granulopoiese, com heterofilia, eosinofilia e que estava correlacionado a um efeito

estimulatório direto do organofosforado sobre a medula. Gromysz-kalkowska e Szubartowska (1993) afirmaram que o anticolinesterásico ocasionou estresse, deste modo aumentando a quantidade total de leucócitos. Outra explicação dada pelos primeiros autores citados foi o bloqueio da migração dos leucócitos para a circulação periférica, aumentando, portanto, a quantidade destes na circulação corpórea. Apesar disso, a constatação de linfopenia reforçou a tese de que a taxa linfóide-mielóide está alterada nas intoxicações e uma imunodepressão com origem numa disfunção hepática poderia estar contribuindo para o quadro. A ação citotóxica direta sobre os heterófilos gerou a forma irregular com que esses se apresentaram. Mandal e Lahiri (1985) obtiveram os mesmos resultados, porém conjuntamente com monocitopenia e basopenia. Graczyk et al., (2003) constataram em perus domésticos que o número de heterófilos está aumentado nos casos estresse e o número de linfócitos se encontra diminuído relativamente, o que configura o leucograma de estresse em aves.

Gromysz-kalkowska e Szubartowska (1993) notaram diminuição no número total de leucócitos, atingindo principalmente linfócitos, e atribuíram o fato a atividade lítica do agente sobre a membrana celular. A constatação de granulocitose heterofílica é conseqüência provável dos mecanismos compensatórios resultantes da perda celular maciça, mas o aumento da dose utilizada levou a um resultado semelhante ao estudo feito por Sharma et al., (1998). Como houve monocitose, suspeitou-se de atividade aumentada do sistema retículo-endotelial decorrente das alterações morfológicas e patológicas nos tecidos.

Westlake et al., (1988) notaram que os níveis séricos da aspartato aminotransferase aumentou significativamente durante experimento com roedores selvagens, o que sugeriu um grande dano aos hepatócitos e a outros tecidos. No entanto, outras enzimas não se mostraram alteradas, o que também foi observado em codornas japonesas tratadas com doses maciças de anticolinesterásico por duas semanas ou com doses menores por oito semanas. No mesmo experimento, demonstrou-se que o peso relativo do fígado também não se alterou. Desta

forma, Westlake et al., (1988) concluíram que as alterações bioquímicas em aves podem não ser significativas e, mesmo em roedores, excetuando-se as alterações das transaminases, elas podem não ser acentuadas o suficiente para caracterizar intoxicação. Do mesmo modo, faisões da espécie *Phasianus colchius* não apresentaram lesões hematológicas, mas apenas histológicas decorrentes da intoxicação (DAY et al., 1995). Porém, Tarrant et al., (1992) encontraram aumento de enzimas indicadoras de lesão hepática em pardais, indicando lesão do órgão.

Guilhermino et al., (1998) encontraram alterações na alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase em ratos machos adultos, indicando que o organofosforado pode ter lesado o tecido hepático e outros tecidos. No mesmo estudo, observaram-se aumentos também na glicemia e um discreto aumento na uréia, mas não houve alterações em parâmetros bioquímico-séricos tais como creatinina, proteína total e albumina.

Ibrahim et al., (2003) citam que não houve alterações no peso corporal, nos lipídios séricos, no colesterol lipoprotéico ou na arterioesclerose artificial quando ministraram no alimento uma pequena dose de diazinon para babuínos, mesmo utilizando uma dieta rica em gordura saturada e colesterol. Estes mesmos autores, utilizando ratos albinos, observaram uma diminuição no colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade quando se aplicou uma dose equivalente a 1/8 da LD₅₀, contrastando com dados de outros autores citados no mesmo artigo, que constataram aumento.

Os resultados derivados de estudos de vários organofosforados sugerem que esses compostos, dependendo de sua formulação, podem causar diferentes alterações em parâmetros hematológicos (GUILHERMINO et al., 1998).

2.5. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS RELACIONADAS AO USO DE INIBIDORES DA COLINESTERASE

Hepatócitos vacuolizados e hipertrofiados foram relatados após a intoxicação com carbaril em peixes (*Puntius conchoni*) depois de 15 dias de tratamento em baixas doses. Em doses mais elevadas e em períodos mais prolongados (30 dias), notou-se lesões mais severas, como picnose e necrose focal. As lesões causadas pelo uso do dimetoato aconteceram apenas após 60 dias de exposição, e foram semelhantes às aquelas observadas com carbaril. Maiores doses ocasionaram desorganização na arquitetura do órgão, ausência de células nucleadas e sinais de necrose lítica. (TEJENDRA, 1988). Ruptura de vasos com hemorragia, picnose, necrose moderada e vacuolização foram encontradas em outras espécies (*Channa punctatus*) expostas a organofosforados, e o autor justificou a vacuolização pela hipóxia gerada pela intoxicação (BRUIYAN, 2001). As lesões hepáticas ocasionadas por organofosforados são inespecíficas, mas todas ocasionam disfunções do órgão (TEJENDRA, 1988).

O fígado do roedor - *Apodemus sylvaticus* - mostrou-se com hepatócitos hipertrofiados e com células de Kupffer em maior número e infiltrado de células mononucleares após a intoxicação com metiocarb e alguns animais apresentaram hepatite com infiltrado leucocitário difuso e leucócitos polimorfonucleares, chegando até a necrose focal. A relação peso corporal/fígado (índice hepatossomático) se mostrou maior em ratos que sobreviveram ao tratamento do que naqueles que morreram devido à intoxicação experimental. Essa constatação talvez se deva a um maior desgaste do fígado naqueles animais que foram mais resistentes à intoxicação (TARRANT et al., 1988).

Pardais (*Passer domesticus*) de vida livre submetidos ou não à intoxicação com demeton-s-metil tiveram lesões semelhantes no grupo controle e intoxicado. Estes focos granulomatosos ocorreram predominantemente em torno dos espaços porta, onde os vasos

continham numerosos monócitos. Estas células também se encontravam próximas aos hepatócitos, sugerindo lesão celular. Os espaços sinusóides também estavam tomados, como nos casos de hepatite. Observou-se vacuolização lipídica, predominantemente como vacúolos de médios a grandes, sem deslocamento do núcleo no fígado de ambos grupos de animais – intoxicados e não intoxicados – especialmente naqueles com infiltrados inflamatórios, indicando dano celular hepático ocasionado por disfunção metabólica (TARRANT et al., 1992).

Um decréscimo no tamanho dos hepatócitos e um aumento significativo na taxa de binucleação foram notados no mesmo estudo em pardais no primeiro dia pós-intoxicação, o que demonstra que a resposta neste caso foi hiperplasia celular face injúria, sem gerar hipertrofia, pois o peso do órgão diminuiu. Além disso, presenciou-se infiltrados de células inflamatórias como áreas granulomatosas, consistindo principalmente de monócitos espalhados difusamente pela secção hepática, nos indivíduos contaminados. Apesar de intoxicados, os pardais se mostravam saudáveis ao exame clínico, fato também descrito para ratos e camundongos (TARRANT et al., 1992).

Contrastando com os dados anteriores, notou-se aumento do fígado conseqüente à hipertrofia dos hepatócitos em roedores submetidos ao diclofor-metil, que foi resultado de binucleação e aumento do DNA intracelular. A severidade das lesões foi classificada baseando-se no infiltrado eosinofílico e nos corpúsculos de inclusão nuclear. Além disso, o aumento do número de hepatócitos anucleados demonstrou que também ocorreu colapso nuclear, levando a necrose nos grupos tratados com doses mais elevadas (WESTLAKE et al., 1988).

Doses elevadas da mesma droga levaram a hipertrofia dos hepatócitos e diminuição da taxa de proteínas plasmáticas, confirmando o diagnóstico de cirrose. O aumento do peso do fígado não foi explicado pelo aumento dos lipídios plasmáticos ou hepáticos, mas pela

degeneração hidrópica ocorrida nas células, já que foram observados apenas microvesículas lipídicas. O mesmo estudo não apresentou resultado semelhante com outro tipo de roedor, observando-se apenas o aumento no peso do fígado. No entanto, o aumento da dose utilizada gerou uma resposta inflamatória com infiltrado linfocitário muito mais acentuada do que no primeiro caso, inclusive com degeneração lipídica. Todas as alterações, no entanto, são passíveis de reversão (WESTLAKE et al., 1988).

Estudos com ratos albinos não mostraram alterações no peso hepático ou corpóreo até 30 dias depois da administração crônica do organofosforado e só a partir daí apareceu degeneração lipídica nos animais tratados, assim como aumento do núcleo e degeneração citoplasmática moderada (BHATNAGAR e JAIN., 1986). A degeneração lipídica pode ter várias causas, como distúrbios intracelulares relacionados ao retículo endoplasmático, aumento da mobilização de lipídios dos tecidos periféricos ou problemas com a liberação da lipoproteína pela célula hepática (ANTONY et al., 1986). Uma provável explicação para o aumento nuclear está na divisão celular desordenada, sem posterior duplicação. Em 60 dias, ocorreu congestão completa dos sinusóides e necrose peri-portal e midzonal dos hepatócitos, com núcleos em cariorrexis (BHATNAGAR e JAIN.

, 1986). O uso do gás sarin em ratos numa dosagem subclínica por um ou dez dias não ocasionou perda de peso dos animais intoxicados (HENDERSON et al., 2002).

Lesões renais incluíram hipertrofia de células tubulares epiteliais, de seus núcleos e exudação da cápsula de Bowman com baixas doses de carbaril. Tempos de exposição de mais de trinta dias revelaram deposição de substância hipercromática não identificada entre os túbulos, com grande infiltração de linfócitos nos interstícios. Lesões degenerativas nos túbulos renais demonstraram distensão dos túbulos após 15 dias da exposição ao dimetoato e 60 dias foram suficientes para gerar vacuolização severa das células tubulares epiteliais acompanhada de picnose, degeneração da superfície de absorção e colapso dos glomérulos. A

desorganização da estrutura tubular pode ser devido à lesão na permeabilidade celular, o que resulta na ligação direta dos metabólitos a enzimas e coenzimas celulares, causando autólise (TAJENDRA, 1988). Em camundongos da madeira (*Apodemus sylvaticus*) alterações nos glomérulos, túbulos e áreas pré-papilares foram observadas (TARRANT et al., 1988). Estudos conduzidos com peixes (*Channa punctatus*) observaram que os rins de animais intoxicados apresentavam degeneração dos túbulos renais e células hematopoiéticas, necrose, picnose e hemorragia (BHUIYAN., 2001).

Com relação ao sistema nervoso central, ratos machos da linhagem Fischer intoxicados subclínicamente pelo gás sarin não apresentaram alteração histopatológica digna de nota (HENDERSON et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a viabilidade do uso da pomba amargosa (*Zenaida auriculata*) como um indicador de contaminação ambiental por organofosforados, mediante observação das alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas derivadas da ingestão do metamidofós.

3.2. ESPECÍFICOS

- A. Avaliar as alterações eritroleucométricas das *Zenaida auriculata* intoxicadas com metamidofós;
- B. Avaliar as alterações bioquímico-sericas dos animais intoxicados;
- C. Investigar alterações macro e microscópicas decorrentes da intoxicação e compará-las ao grupo controle, dando especial atenção à histopatologia de órgãos afetados, como fígado, rins e sistema nervoso central.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Setor de Doenças de Aves do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal.

4.2 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizadas 24 pombas da espécie *Zenaida auriculata*, machos ou fêmeas, adultas, capturadas no perímetro urbano da cidade de Jaboticabal, SP. As aves foram divididas em dois grupos experimentais: grupo controle, com 8 animais e grupo intoxicado, composto por 16 animais. A captura foi realizada com armadilha do tipo alçapão, em maio de 2005. As aves foram mantidas em gaiolas de arame galvanizado, com dimensões de 1,0 x 0,85 x 0,85 metro, com bebedouros contendo água à vontade e comedouros contendo dieta para pintos, fase inicial, com ração fornecida *ad libitum*.

4.3 INTOXICAÇÃO, ROTINA DE COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO, QUARENTENA E EXAME CLÍNICOS DAS AVES.

Quarentena das aves

No primeiro dia, logo após a captura, foram coletadas amostras de fezes dos animais, para verificar parasitas intestinais, usando-se o teste de flutuação pelo método de Willis. Foi

constatada a presença de ovos de trematoda e os animais foram então tratados com 0,75 mg/kg de ivermectina. Após 15 dias, um novo exame coproparasitológico foi realizado, não se observando parasita. Foram incluídas no experimento aves consideradas híidas após avaliação clínica e parasitológica. Na avaliação clínica, considerou-se o estado geral da ave, sua atividade, a presença de diarreia e de secreções oculares e nasais, o estado das penas e a exuberância da musculatura em torno do externo. Os animais permaneceram quarenta dias em cativeiro antes do início do experimento.

Intoxicação das aves, rotina de coletas e avaliação pós-intoxicação.

Após o período de quarentena, intoxicaram-se 16 animais com a DL₅₀ mínima oral estabelecida para codornas, ou seja, 8 mg/Kg de metamidofós, sob a forma de Tamaron® (MEINSTER, 1995), ministrados por sonda esofagiana, dissolvidos em solução fisiológica. Foi feito um piloto e tal dosagem foi estabelecida após a intoxicação pré-experimental de quatro grupos, cada um com dois animais cada, recebendo doses de 5, 8, 10 e 15 mg/kg, constatando-se que a maior dose que causava sintomas clínicos sem ocasionar mortes era a de 8 mg/Kg. Após a administração, as aves foram avaliadas para se constatar a eficácia da intoxicação, observando-se sinais como ataxia, paresia, paralisia ou outros sintomas nervosos (RESANOVICK et al., 1996). Quatro horas antes da aplicação do inibidor da colinesterase, os animais tiveram sua alimentação suspensa, a fim de se evitar a interação com alimentos contidos no trato digestório.

Acompanharam-se os animais intoxicados 21 dias, e neste período foram realizadas coletas de sangue, em seguida, eutanásias, a primeira doze horas após a intoxicação e as demais de três em três dias após o início do experimento. A cada coleta, eram eutanasiados 2 animais do grupo intoxicado. Consideraram-se T1 - doze horas após a intoxicação, T2 – três

dias após a intoxicação, T3 – seis dias após a intoxicação, T4 – nove dias após a intoxicação, T5 – doze dias após a intoxicação, T6 – quinze dias após a intoxicação, T7 – dezoito dias após a intoxicação e T8 – vinte e um dias após a intoxicação.

Para determinação da glicemia foram coletadas amostras de sangue da veia basílica ou do plexo jugular, utilizando-se seringas e agulhas descartáveis contendo EDTA fluoretado como anti-coagulante. O restante do sangue colhido foi fracionado em duas alíquotas, uma parte com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético dissódico) para a realização do hemograma e a outra sem anticoagulante para posterior obtenção do soro para realização de testes bioquímicos. Os animais eram sacrificados e, posteriormente, necropsiados para se verificar as alterações macroscópicas e coletar fígado, rins e sistema nervoso central para exames histopatológicos.

4.4 GRUPO CONTROLE

O grupo controle, composto de oito animais, foi submetido à mesma rotina de coletas do grupo intoxicado, e os animais foram sacrificados simultaneamente, logo no primeiro dia de experimento, após a quarentena em cativeiro. Para simular condições semelhantes, o veículo (solução fisiológica) foi ministrado da mesma forma, por via oral, sem a presença do metamidofós.

4.5 EXAMES HEMATOLÓGICOS

Ao exame hematológico determinaram-se os números totais de eritrócitos e leucócitos, valor do hematócrito, índices hematimétricos absolutos (volume corpuscular médio - VCM e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM) e contagem diferencial de

leucócitos em esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de metanol, May-Grunwald e Giemsa (MMG). A fim de se minimizar as variações decorrentes do observador, a leitura leucocitária relativa foi obtida por quatro diferentes leitores e depois foi calculada a média entre as contagens.

As contagens totais de hemácias e leucócitos foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando-se como diluidor o azul de toluidina a 0,01%. O volume globular ou VG foi obtido pela técnica do micro-hematócrito, e o cálculo dos índices hematimétricos absolutos pela relação matemática entre HT/HC (VCM) e Hb/HT (CHCM) (JAIN, 1986).

4.6 OBTENÇÃO DO SORO

Após a coagulação do sangue submeteu-se a amostra a centrifugação (3000 g) por 10 minutos e separou-se a amostra da fração sérica. As amostras de soro destinada aos exames bioquímicos foram mantidas congeladas até o momento de seu processamento.

4.7 MENSURAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA

A glicemia foi determinada pelo método da ortotoluidina com auxílio de reagentes comerciais da Labtest®. A leitura da amostras foi realizada por espectrofotometria (espectrofotômetro semi-automático Labquest® da Labtest®)* e o espectrofotômetro foi utilizado em todos os procedimentos onde se mensurou a bioquímica sérica.

* Labtest® Sistema de Diagnósticos LTDA – Belo Horizonte/MG.

4.8 DOSAGEM DE LIPÍDIOS

Os triacilgliceróis das lipoproteínas foram quantificados pelo método proposto por NAGELE et al., (1984). O colesterol total foi quantificado pelo método proposto por GOOD et al., (1966), modificado por ALAIN et al., (1974) sendo que, em ambos os métodos, utilizaram-se conjuntos de reagentes (Labtest®) e leituras espectrofotométricas. As lipoproteínas de alta densidade foram dosadas com auxílio composto de reagentes enzimáticos (Labtest®) e leituras espectrofotométricas.

4.9 ATIVIDADE DE TRANSAMINASES

A atividade sérica da enzima aspartato aminotransferase (AST) foi determinada por espectrofotometria com auxílio de composto de reagentes (Labtest Sistemas de Diagnósticos LTDA – Belo Horizonte/MG) e leituras espectrofotométricas.

4.10 PROVAS DE FUNCIONALIDADE RENAL

Dosaram-se as concentrações de ácido úrico (AUR) e uréia com auxílio de composto de reagentes (Labtest®) e leituras espectrofotométricas.

4.11 COSCIENTE DO PESO DO FÍGADO/PESO CORPORAL (ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO – IHS)

À necropsia foram pesados o animal e seu fígado para obtenção do IHS, estabelecido pelo quociente do peso do fígado/peso corporal.

4.12 VALORES BIOMÉTRICOS

Foram retirados fragmentos de fígado, rins e sistema nervoso central para análise histopatológica. A conservação dos tecidos foi feita em solução de formalina tamponada a 10%, estabelecendo-se um tempo de fixação de 24 horas. Como a espessura dos órgãos coletados era inferior a 0,5 cm, optou-se por fixar todo o órgão, possibilitando a avaliação de diversas porções dos mesmos.

O material foi então processado segundo a rotina do Laboratório de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP. Os fragmentos foram desidratados em soluções crescentes de álcoois e diafanizados em xilol, para inclusão em blocos de parafina histológica.

Os cortes feitos ao micrótomo foram obtidos com a espessura de 3 a 4 μm , dispostos em lâminas de vidro e recobertos com um delgado filme de Poly-l-lisina (Sigma P-1399) diluída a 0,01% para manter o corte aderido às lâminas. Estas foram mantidas na estufa a 60°C por uma hora e submetidas à desparafinização em xilol e reidratação em diluições decrescentes de álcoois.

Os cortes histológicos foram, finalmente, corados com hematoxilina-eosina para sua posterior avaliação histoscópica.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos para as diferentes características bioquímico-séricas e hematológicas dos animais controle e intoxicados foram submetidos à análise de variância e suas médias confrontadas pelo teste *t* de *Student* para dados não pareados. Para efetuar o referido teste, comparou-se a média do grupo intoxicado, em cada momento estabelecido (T1-

T8), com a média do controle. Valores de p inferiores a 5% foram considerados significativos.

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa computacional SAS (SAS, 2003).

5. RESULTADOS

5.1 HEMOGRAMA E ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS

Os valores obtidos para as concentrações globais de hemácias e de leucócitos, a concentração de hemoglobina, as contagens diferenciais leucocitárias para os eosinófilos e heterófilos se mostraram significativamente alterados nos animais intoxicados em relação à média dos controles. O hematócrito não apresentou alterações estatisticamente significativas (Tabela 1).

As contagens globais de hemácias diminuíram em T2 (Figura 1) e a hemoglobina aumentou em T5, T6 e em T8 (Figura 2) para os intoxicados comparados aos controle. As contagens globais de leucócitos aumentaram nos tempos T1, T2, T5 e T8 (Figura 3) para os intoxicados comparados aos controle. O número relativo de eosinófilos diminuiu em T7 (Figura 4), enquanto que o de heterófilos aumentou em T1, T2 e em T8 (Figura 5). Os linfócitos, neutrófilos bastonetes, monócitos e basófilos não tiveram alterações dignas de nota e estavam ausentes na maior parte das amostras verificadas.

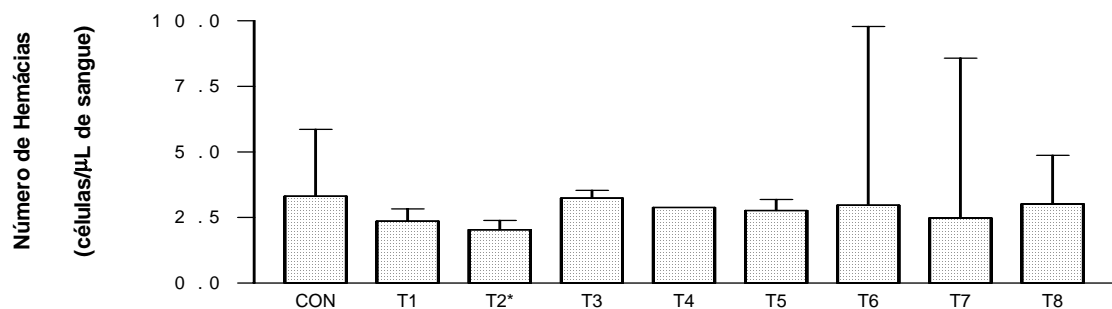


Figura 1. Representação gráfica da variação do número de hemácias/μL. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) $n=8$, e em cada T (tempo) $n=2$, totalizando 16 intoxicados. A leitura dos controle

foi realizada em 06/07/2005 e dos intoxicados nos dias 02/08/2005 (T1), 04/08/2005 (T2), 07/08/2005 (T3), 10/08/2005 (T4), 13/08/2005 (T5), 16/08/2005 (T6), 19/08/2005 (T7) e 22/08/2005 (T8), no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.

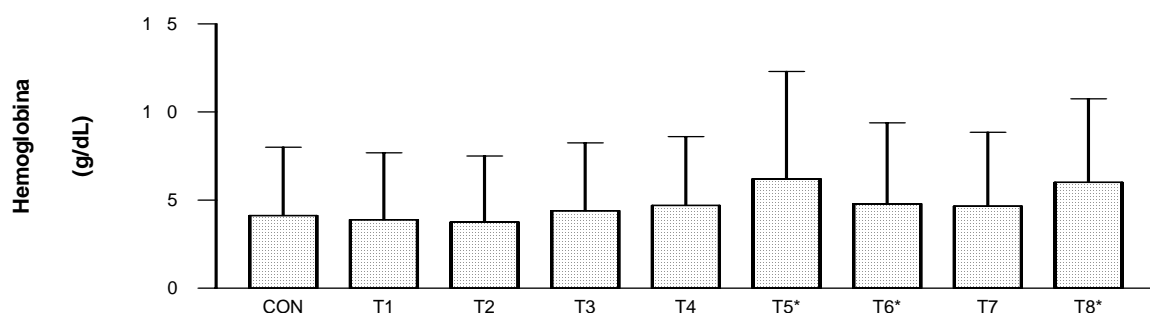


Figura 2. Representação gráfica da variação da concentração de hemoglobina. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) $n=8$, e em cada T (tempo) $n=2$, totalizando 16 intoxicados. O ensaio dos controle foi realizado em 06/07/2005 e dos intoxicados nos dias 02/08/2005 (T1), 04/08/2005 (T2), 07/08/2005 (T3), 10/08/2005 (T4), 13/08/2005 (T5), 16/08/2005 (T6), 19/08/2005 (T7) e 22/08/2005 (T8), no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP, Campus de Jaboticabal.

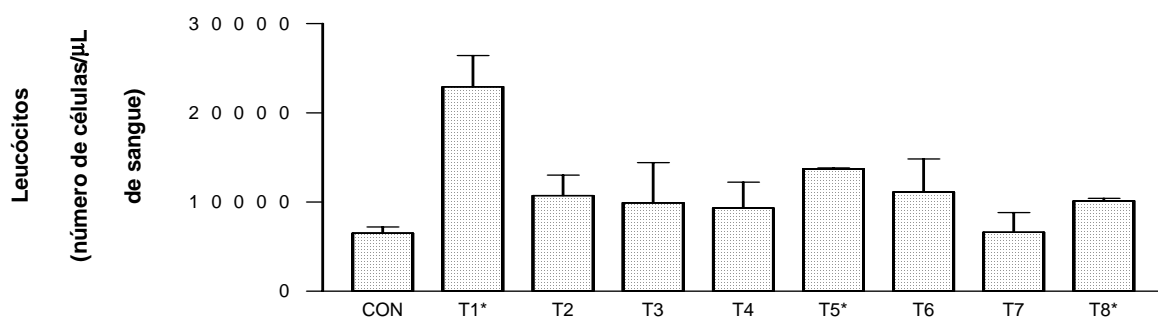


Figura 3. Representação gráfica da variação do número de leucócitos/ μL . Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle)

n=8, e em cada T (tempo) n=2, totalizando 16 intoxicados. A leitura dos controle foi realizada em 06/07/2005 e dos intoxicados nos dias 02/08/2005 (T1), 04/08/2005 (T2), 07/08/2005 (T3), 10/08/2005 (T4), 13/08/2005 (T5), 16/08/2005 (T6), 19/08/2005 (T7) e 22/08/2005 (T8), no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.

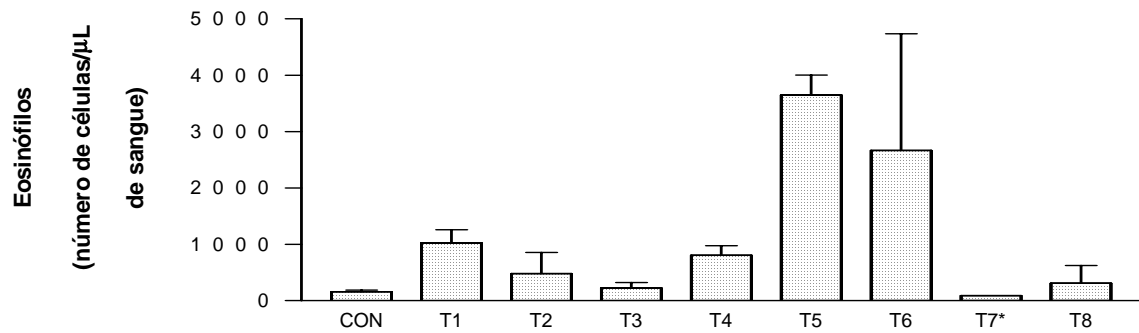


Figura 4 Representação gráfica da variação do número de eosinófilos/μL. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p<0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) n=8, e em cada T (tempo) n=2, totalizando 16 intoxicados. As leituras foram realizadas nos dias 04/09/2005 e 05/09/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, campus de Jaboticabal.

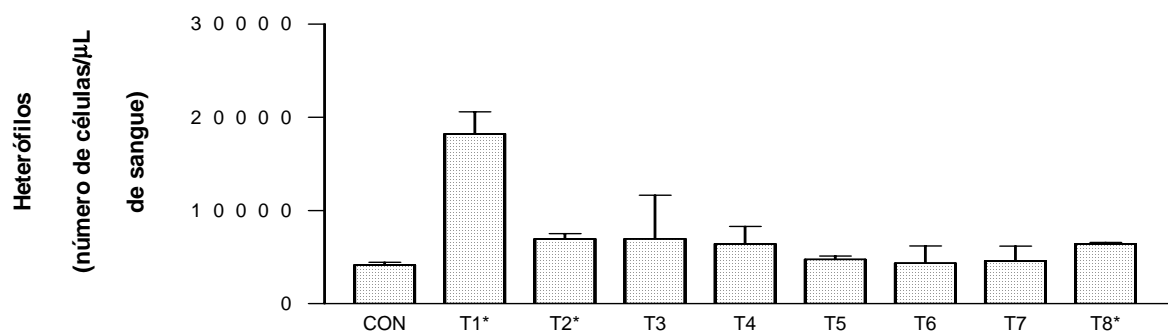


Figura 5. Representação gráfica da variação do número total de heterófilos/μL. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p<0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) n=8, e em cada T (tempo) n=2, totalizando 16 intoxicados. As leituras foram realizadas nos dias

04/09/2005 e 05/09/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, campus de Jaboticabal.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos da série vermelha, série branca, índices hematimétricos e índice hepatossomático de aves controle e intoxicadas. Os valores indicam as médias \pm os erros padrões da média. O ensaio dos controle foi realizado em 06/07/2005 e dos intoxicados nos dias 02/08/2005 (T1), 04/08/2005 (T2), 07/08/2005 (T3), 10/08/2005 (T4), 13/08/2005 (T5), 16/08/2005 (T6), 19/08/2005 (T7) e 22/08/2005 (T8), no Departamento de Patologia Animal, exceto a hemoglobina, que foi mensurada no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, ambos departamentos da UNESP, Campus de Jaboticabal.

	Nº. de hemácias/ $\mu\text{L} (\times 10^6)$	Hematócrito (%)	Hemo globina (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)	IHS	Leucócitos / μL	Eosinófilo s/ μL	Heterófilo s/ μL	Linfócitos/ μL
CONTROLE	3.31 \pm 2.56	37.63 \pm 23.37	8.01 \pm 0.25	11.70 \pm 0.86	21.83 \pm 1.4	0.019 \pm 0	6489 \pm 702	161 \pm 28	4147 \pm 297	4100 \pm 531
T1	2.36 \pm 0.47	35.5 \pm 0.5	7.7 \pm 0.1	15.02 \pm 0.09	21.69 \pm 0.02	0.022 \pm 0	22900 \pm 3500*	1026 \pm 234	18202 \pm 2390*	3623 \pm 1392
T2	2.04 \pm 0.35*	32 \pm 0	7.5 \pm 0	15.72 \pm 0.27	23.44 \pm 0	0.015 \pm 0	10700 \pm 2300*	481 \pm 377	6946 \pm 562*	3225 \pm 1293
T3	3.24 \pm 0.3	35.5 \pm 3.5	8.25 \pm 0.55	10.97 \pm 1.18	23.62 \pm 3.88	0.0165 \pm 0	9910 \pm 4510	230 \pm 95	6956 \pm 4688	2684 \pm 232
T4	2.89 \pm 0	32.5 \pm 1.5	8.6 \pm 0.8	11.24 \pm 0.52	26.40 \pm 1.24	0.017 \pm 0.001	9300 \pm 2900	808 \pm 168	6412 \pm 1884	2080 \pm 848
T5	2.77 \pm 0.42	43 \pm 1	12.3 \pm 0.1*	15.55 \pm 0.6	28.62 \pm 0.89	0.015 \pm 0	13700 \pm 100*	3650 \pm 352	4729 \pm 377	5184 \pm 630
T6	2.97 \pm 6.82	37 \pm 5	9.4 \pm 0.2*	12.76 \pm 1.25	25.80 \pm 2.94	0.0175 \pm 0	11100 \pm 3700	2664 \pm 207	4347 \pm 1831	4088.5 \pm 203.5
T7	2.48 \pm 6.10	38 \pm 4	8.85 \pm 0.45	15.92 \pm 2.31	23.675 \pm 3.67	0.0155 \pm 0	6600 \pm 2200	88 \pm 0*	4598 \pm 1562	1870 \pm 594
T8	3.02 \pm 1.85	42 \pm 7	10.75 \pm 1.25*	14.1 \pm 3.18	25.815 \pm 1.32	0.016 \pm 0	10100 \pm 300*	312 \pm 312	6403 \pm 163*	3385 \pm 151

* mostra onde houve diferença estatística ($p < 0,05$). Em CONTROLES n=8, e em cada T (tempo) n=2, totalizando 16 intoxicados.

5.2 BIOQUÍMICA SÉRICA

Verificou-se diferença significativa apenas com relação à uréia, que se apresentou aumentada em T1 e T5 após a exposição, não se observando oscilações dignas de nota para as outras análises e outros tempos (Figura 6 e Tabela 2).

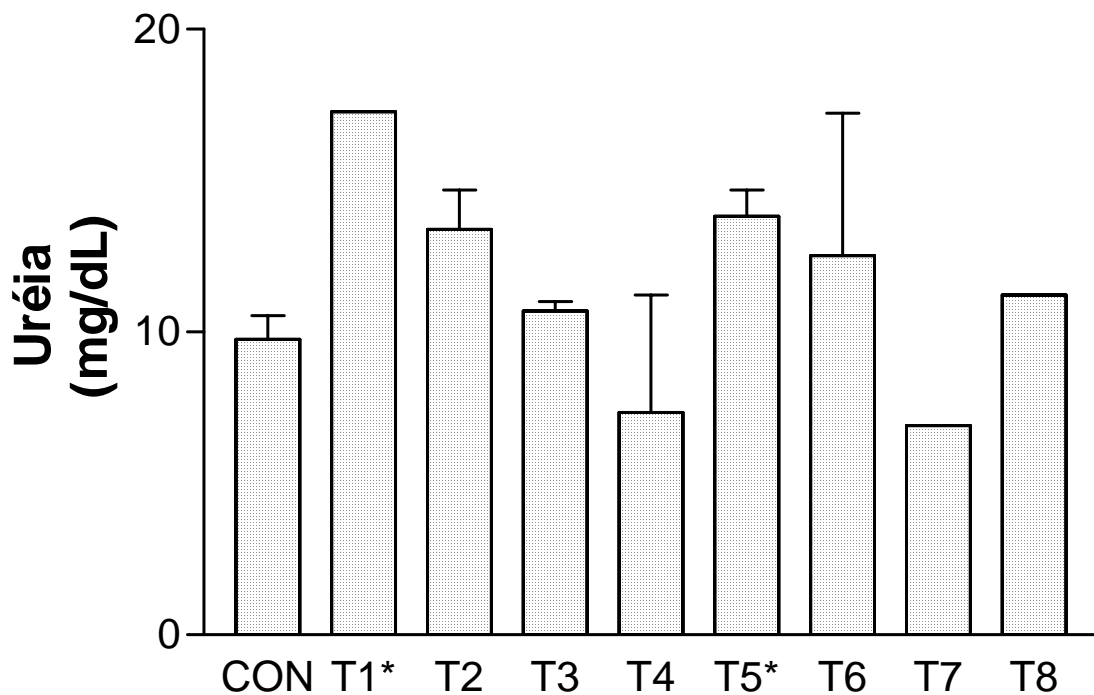


Figura 6. Representação gráfica das médias de uréia. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$) e o erro padrão da média está representado nas linhas que cortam os gráficos verticalmente. Em con (controle) $n=8$, e em cada T (tempo) $n=2$, totalizando 16 intoxicados. O ensaio foi realizado no dia 05/10/2005 e 06/10/2005, no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP, Campus de Jaboticabal.

Tabela 2. Parâmetros bioquímico-séricos e plasmáticos de aves controle e intoxicadas. Os valores indicam as médias \pm os erros padrões da média. Os ensaios foram realizados no dia 05/10/2005 e 06/10/2005, no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP, Campus de Jaboticabal.

	AST (U/L)	TG (mg/dL)	AUR (mg/dL)	CT (mg/dL)	GL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	URÉIA(mg/dL)
Aspartato		Triglicérides	Ácido Úrico	Colesterol Total	Glicose	Lipoproteínas de Alta Densidade	
CONTROLES	672 \pm 109	128,38 \pm 18,30	10,25 \pm 1,93	233,75 \pm 25,25	319,75 \pm 21,92	9,5 \pm 1,78	9,75 \pm 0,79
T1	608 \pm 20	88,5 \pm 10,5	7,6 \pm 0	330 \pm 30	334 \pm 15	7 \pm 0	17,28 \pm 0*
T2	857 \pm 109	152 \pm 49	13,095 \pm 3,81	274 \pm 36	230 \pm 6	12 \pm 3	13,39 \pm 1,3
T3	972 \pm 0	86,5 \pm 3,5	12,54 \pm 0	265 \pm 43	19 \pm 0	19 \pm 0	10,69 \pm 0,32
T4	743 \pm 20	97,5 \pm 7,5	8,765 \pm 0,21	303 \pm 69	260,5 \pm 18,5	7,5 \pm 6,5	7,34 \pm 3,89
T5	908 \pm 0	113,5 \pm 15,5	15,52 \pm 1,10	215 \pm 12	328 \pm 2	15 \pm 1	13,825 \pm 0,86*
T6	518 \pm 89	152,5 \pm 34,5	12,59 \pm 2,43	244,5 \pm 23,5	273,5 \pm 15,5	10 \pm 3	12,53 \pm 4,76
T7	918 \pm 85	92 \pm 9	5,51 \pm 2,45	217,5 \pm 39,5	348 \pm 59	4,5 \pm 0,5	6,91 \pm 0
T8	273,55 \pm 153	121,5 \pm 10,5	11,31 \pm 0	287 \pm 12	298 \pm 15	15 \pm 1	11,23 \pm 0

* mostra onde houve diferença estatística ($p < 0,05$). Em CONTROLES n=8, e em cada T (tempo) n=2, totalizando 16 intoxicados.

5.4 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS OBSERVADAS AO EXAME NECROSCÓPICO

Durante as necropsias, observaram-se algumas lesões em alguns indivíduos e foram encontradas em ambos os grupos. A maior parte das lesões pode ser correlacionada à presença de hemoparasitas e parasitas, como a esplenomegalia e a presença de petéquias, à falta de alimentos no trato digestório, como a presença de biliverdina no trato gastrintestinal e a lesões mecânicas, como a fratura de externo.

Quadro 1. Alterações macroscópicas observadas às necropsias dos animais controle realizadas em 06/07/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.

ANIMAL	ALTERAÇÃO
C1	Ausente
C2	Ausente
C3	Solução de continuidade com 0,8 cm de diâmetro em região peitoral com exposição de musculatura e infecção. Fratura antiga de externo e esplenomegalia acentuada
C4	Esplenomegalia moderada
C5	Esplenomegalia e discreta coloração cobre no baço
C6	Esplenomegalia
C7	Esplenomegalia
C8	Ausente

Quadro 2. Alterações macroscópicas observadas às necropsias dos animais intoxicados, realizadas nos dias 02/08/2005 (1 e 2), 04/08/2005 (3 e 4), 07/08/2005 (5 e 6), 10/08/2005 (7 e 8), 13/08/2005 (9 e 10), 16/08/2005 (11 e 12), 19/08/2005 (13 e 14) e 22/08/2005 (15 e 16), no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal..

ANIMAL	ALTERAÇÃO
1	Ausente
2	Esplenomegalia
3	Ausente
4	Fezes com biliverdina
5	Ausente
6	Esplenomegalia discreta e presença de <i>Paratansia sp</i> nos ureteres.
7	Esplenomegalia
8	Ausente
9	Ausente
10	Presença de <i>Pseudolynchia sp.</i>
11	Esplenomegalia e presença de lêmbras
12	Ausente
13	Esplenomegalia e acúmulo adiposo na cavidade celomática
14	Ausente
15	Petéquias na asa
16	Esplenomegalia

5.4 ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS OBSERVADAS AO EXAME HISTOPATOLÓGICO

As alterações observadas nos órgãos foram semelhantes nos animais controle e nos intoxicados. No fígado de ambos os grupos foi encontrado infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal, além de degeneração hidrópica difusa. Nos rins também se notou um mesmo padrão entre controles e intoxicados, destacando-se o infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal, a presença de parasitas e a calcificação tubular. Não se notificou nenhuma lesão digna de nota no sistema nervoso central. A lista do histopatológico do fígado e rins se encontra a seguir:

Quadro 3. Descrição das lesões histológicas observadas no fígado dos animais controle. As leituras foram realizadas no dia 04/12/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.

ANIMAL	ALTERAÇÃO
1	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal e moderada degeneração hidrópica difusa.
2	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal e moderada degeneração hidrópica difusa.
3	Moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal.
4	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal e acentuada degeneração hidrópica difusa.
5	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal, acentuada degeneração hidrópica difusa e discreto acúmulo de hemossideína multifocal.
6	Acentuada degeneração hidrópica difusa.
7	Acentuada degeneração hidrópica difusa e células de Kuppfer difusas pelo órgão com hemossiderina.
8	Moderada degeneração hidrópica difusa.

Quadro 4. Descrição das lesões histológicas observadas no fígado dos animais intoxicados. As leituras foram realizadas no dia 04/12/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.

ANIMAL	ALTERAÇÃO
1	Degeneração hidrópica discreta difusa, mais acentuada na região perivascular e células de Kupffer difusas pelo órgão, com hemossiderina.
2	Moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal, moderada degeneração hidrópica multifocal e discreta hemorragia focal.
3	Ausente
4	Discreta degeneração hidrópica difusa, mais acentuada na região centrolobular.
5	Discreto e difuso acúmulo de hemossiderina.
6	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal, discreto acúmulo de hemossiderina em região perivascular.
7	Moderada degeneração hidrópica difusa e células com hemossiderina em um foco.
8	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal predominantemente perivascular, com degeneração hidrópica e acúmulo de hemossiderina.
9	Moderada degeneração hidrópica difusa com discreta alteração nuclear (picnose).
10	Moderada degeneração hidrópica difusa com discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal.
11	Moderada degeneração hidrópica difusa, células de Kupffer com hemossiderina, difusas pelo órgão e moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal com hemorragia discreta multifocal.
12	Hemorragia discreta focal com discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal perivascular.
13	Discreto infiltrado inflamatório multifocal, predominantemente perivascular.
14	Discreto infiltrado inflamatório multifocal.
15	Discreto infiltrado inflamatório multifocal e moderada degeneração hidrópica difusa.
16	Discreto infiltrado inflamatório multifocal e discreto acúmulo de hemossiderina multifocal.

Quadro 5. Descrição das lesões histológicas observadas nos rins dos animais controle. As leituras foram realizadas no dia 02/12/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.

ANIMAL	ALTERAÇÃO
1	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal.
2	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores, discreta hemorragia focal e infiltrado inflamatório polimorfonuclear focal.
3	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores e discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear focal.
4	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores e discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal.
5	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal.
6	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores, discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal e discreta calcificação tubular multifocal.
7	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores e discreto infiltrado inflamatório misto predominantemente polimorfonuclear multifocal.
8	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal.

Quadro 6. Descrição das lesões histológicas observadas nos rins dos animais intoxicados. As leituras foram realizadas no dia 02/12/2005 no Departamento de Patologia Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal.

ANIMAL	ALTERAÇÃO
1	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear focal.
2	Moderada degeneração tubular gordurosa difusa e discreta calcificação tubular focal.
3	Moderada degeneração tubular vacuolar difusa, com discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear focal
4	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores e discreta degeneração tubular difusa.
5	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores e discreta degeneração tubular difusa, com infiltrado inflamatório misto devido a um parasita morto.
6	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores, discreta hemorragia focal, com infiltrado inflamatório polimorfonuclear moderado difuso e um túbulo com moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear (parasita morto).
7	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores, discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal e discreta degeneração tubular focal
8	Discreta hemorragia focal e discreto infiltrado inflamatório multifocal.
9	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores, discreta hemorragia focal, infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal e discreta calcificação tubular multifocal.
10	Discreta hemorragia multifocal.
11	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores, moderada hemorragia multifocal e infiltrado inflamatório multifocal.
12	Moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal ao redor dos túbulos, com discreta calcificação.
13	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores, moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal e discreta degeneração hialina da cápsula de Bowman.
14	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal.
15	Presença de trematoda no interior dos túbulos coletores e discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal
16	Discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear multifocal.

6. DISCUSSÃO

6.1 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

O número total de hemácias diminuiu em T2 ($2.04 \times 10^6 \pm 0.35 \times 10^6$ céls/ μ L), como aconteceu nos experimentos de Mandal e Lahiri (1985), Gromysz-kalkowska e Szubartowska (1993), Sharma et al., (1997), Sharma et al., (1998). Segundo Sharma et al., (1998), o organofosforado diminui as concentrações de eritropoietina, agindo sobre a medula diretamente ou, indiretamente, através da redução nos níveis de catecolaminas. Gromysz-kalkowska e Szubartowska (1993) teorizam que pode ocorrer uma lise direta a parede do vaso pelo organofosforado. No entanto, a diminuição só foi significativa três dias após a intoxicação, o que sugere que, neste caso, ela foi limitada às fases subseqüentes à exposição aguda.

Não foi verificada alteração significativa relacionada ao volume globular, ao volume corpuscular médio e à concentração de hemoglobina corpuscular média nos animais tratados em relação aos controle, o que também foi observado por Day et al., (1995), trabalhando com faisões intoxicados com malation. O metamidofós não interfere com intensidade nestes parâmetros na dose e na espécie utilizada.

A hemoglobina se mostrou aumentada em T5 (12.3 ± 0.1 g/dL), T6 (9.4 ± 0.2 g/dL) e T8 (10.75 ± 1.25 g/dL), o que significa que o agente continua causando desidratação (GUILHERMINO et al., 1998) por vários dias, já que essa constatação foi feita doze, quinze e vinte e um dias após a intoxicação.

O índice hepatossomático não foi alterado, coincidindo com o relato de Westlake et al., (1988) que não verificaram alteração do peso do fígado ou das transaminases hepáticas em codornas japonesas. Tarrant et al., (1992) constataram diminuição no índice hepatossomático quando aplicou demeton-s-metil em pardais, mesmo observando que o fígado tendia a sofrer binucleação em face à injúria da intoxicação. Westlake et al., (1988) obtiveram aumento deste índice em camundongos selvagens intoxicados com diclofor-metil. Bhatnagar e Jain (1986) não evidenciaram diferenças quando compararam as alterações ocorridas em ratos machos adultos intoxicados com phosphamidon e seus controle. Outro experimento, usando metiocarb em roedores, causou a diminuição do peso do órgão (TARRANT e WESTLAKE, 1988).

Houve aumento significativo no número de leucócitos em T1 (22900 ± 3500 céls/ μ L), T2 (10700 ± 2300 céls/ μ L), T5 (13700 ± 100 céls/ μ L) e T8 (13700 ± 100 céls/ μ L), assim como ocorreu nos estudos de Sharma et al., (1998) que relataram um aumento da

granulopoiese da série branca quando utilizaram furadan SP50 em *Columba livia*, associando o achado a um efeito estimulatório direto do organofosforado sobre a medula ou mesmo a uma dificuldade encontrada pelos leucócitos em migrar para a circulação periférica. Gromysz-kalkowska e Szubartowska (1993) associaram o aumento no número de leucócitos em rãs intoxicadas por fenitroton a um provável estresse ocasionado pelo organofosforado, que gerou aumento no cortisol plasmático.

O número de eosinófilos diminuiu significativamente em T7 (88 ± 0 céls/ μ L), diferentemente do ocorrido no experimento de Sharma et al., (1998) e Mandal e Lahiri (1985). No entanto, não se pode afirmar que tais alterações ocorreram pelo uso do organofosforado, já que os animais encontravam-se parasitados por *Hemoproteus sp.*, além de possuírem trematóides mortos e parasitas externos como *Pseudolynchia sp.* e lêmias, o que pode ocasionar eosinofilia (FORBES, 2001). A ivermectina não é eficiente para combater hemoparasitoses, como descrito por Spinosa et al., 1999, e os parasitas externos foram contraídos posteriormente a desparasitação, pois a grade das gaiolas tinha largura suficiente para permitir a passagem destes. Provavelmente, os animais eutanasiados em T7 estavam menos parasitados que os demais ou apresentavam uma resposta menos agressiva ao parasita, e por isso apresentaram um número de eosinófilos diminuído.

O número de heterófilos aumentou em T1 (18202 ± 2390.5 céls/ μ L), T2 (6945.8 ± 561.65 céls/ μ L) e em T8 (6403 ± 163 céls/ μ L) o que demonstra que o efeito estimulatório do organofosforado sobre a medula fez prevalecer principalmente esse tipo de célula: em três dos quatro tempos onde houve alteração do número de leucócitos aconteceu uma alteração significativa principalmente do número de heterófilos (SHARMA et al., 1998). Além disso Gromysz-kalkowska e Szubartowska (1993), ressaltam que a granulocitopoiese heterofilica é resultado dos mecanismos compensatórios resultantes da perda celular maciça gerada por ação direta sobre a membrana ou por dano à parede vascular. Graczyk et al., (2003) constataram em perus domésticos que o número de heterófilos está aumentado nos casos estresse e o número de linfócitos se encontra diminuído relativamente, o que configura o leucograma de estresse em aves, sendo um quadro similar ao ocorrido neste experimento. Este é um quadro semelhante ao encontrado neste estudo, o que demonstra um claro leucograma de estresse.

A ausência de alterações nos linfócitos, bastonetes, monócitos e basófilos estão em concordância com os dados de Day et al., (1985) e Guilhermino et al., (1998), mas diferem de Mandal e Lahiri (1985) que obtiveram monocitopenia e basopenia, além de Gromyszkalkowska e Szubartowska, (1993), que observaram monocitose. Provavelmente, o metamidofós tenha uma ação limitada sobre esses tipos celulares na espécie e dose estudadas.

Os valores relativos à uréia apresentaram-se aumentados nos intoxicados em relação aos animais controle em T1 ($17,28 \pm 0$ mg/dL) e em T5 ($13,825 \pm 0,86$ mg/dL), e o achado é concordante com os resultados de Guilhermino et al., (1998). Estes autores explicam seus dados como sendo devidos a hemoconcentração decorrente de uma desidratação moderada. A hiperglicemia é conseqüência da intoxicação por alguns organofosforados, como o paration (GUILHERMINO et al., 1998), mas tal alteração não foi encontrada neste experimento.

Não houve diferença significativa com relação à aspartato aminotransferase, o que também foi citado por Westlake et al., (1988) em codornas japonesas, e, segundo os autores, talvez seja devido à maior resistência das aves a alterações da enzima. Entretanto, Tarrant et al., (1992) encontraram aumento da atividade dessas enzimas em pardais submetidos ao demeton-s-metil, o que sugere que alguns organofosforados podem gerar lesão celular.

Ibrahim et al., (2003) em estudos experimentais concluíram que o colesterol lipoprotéico e os lipídios séricos podem não ser alterados em intoxicações por via oral em pequenas doses, resultado também observado em nosso experimento, mesmo utilizando-se doses que levaram a um quadro clínico de intoxicação. No entanto, este achado discorda com o encontrado por alguns autores, que obtiveram aumento ou mesmo redução nos lipídeos de alta densidade, no colesterol total e nos triglicérides (IBRAIM et al., 2003).

Não foram encontradas alterações referentes às concentrações do ácido úrico e as informações da literatura também são pouco numerosas com relação a essa enzima, principalmente em aves, mostrando que mais experimentos são necessários. A espécie utilizada parece não sofrer alterações neste parâmetro quando intoxicada com o metamidofós na dose utilizada.

6.2 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS

As alterações macroscópicas observadas às necrópsias não tiveram relação direta com a intoxicação por organofosforados, em conformidade com a literatura (ANTHONY et al., 1986; WESTLAKE et al., 1988; TARRANT et al., 1992), onde a maior parte dos autores não

observa lesões macroscópicas. A maior parte das alterações observadas no experimento pode ser explicada pela presença de parasitas e por lesões mecânicas.

6.3 ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS

Não é possível estabelecer um padrão entre as alterações histológicas dos controles e dos intoxicados, pois ambos os grupos apresentaram lesões semelhantes. Tal fato também ocorreu em de pardais de vida livre utilizados por Tarrant et al., (1992), mas este pesquisador notou que as lesões eram mais severas nos intoxicados.

7. CONCLUSÕES

A pomba amargosa – *Zenaida auriculata* – não se mostrou uma espécie adequada como bioindicador ambiental para o uso de anticolinesterásicos pelos parâmetros estudados ou mesmo pela correlação destes. As alterações geradas por organofosforados são muitas vezes discrepantes e dependem da dose, da espécie, do princípio ativo, da idade do animal e das condições ambientais.

A utilização de outros parâmetros mais específicos, como a avaliação da inibição das colinesterases séricas e cerebrais, pode ser uma maneira mais adequada para avaliar o uso desta espécie como indicador de qualidade ambiental em lavouras que usem agrotóxicos.

8. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.P. Probable diazinon poisoning in peafowl: A clinical description. **Veterinary Record**, London, v. 113, n. 19/20, p. 470, 1983.

ALLAIN, C. A et al. Enzymatic determination of total serum-cholesterol. **Clinical Chemistry**, Washington D.C., v. 20, p. 470-475, 1974.

ANÔNIMO. **HSDB: Hazardous substances data bank**. Denver: National Library of Medicine, 1 CD-ROM, 1990.

ANTHONY, J. et al. Effect of sublethal levels of diazinon: histopathology of liver. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 37, p.501-507, 1986.

ANTONIOUS, G. F. ZINDER J.C. Residues and half-Life of acephate, methamidophos and pirimiphos-methyl in leaves and fruits of greenhouse-grown tomatoes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 52, p.141-148, 1994.

BARON, R.L. Carbamate insecticides. In: HAYES, W.R., LAWS, E.R. **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego, Academic Press, 1991. p. 1125-1190.

BHATNAGAR, P.; JAIN, N. Morphofunctional changes in the liver of male mice after chronic treatment with phosphamidon. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 37, p.767-773, 1986.

BHUIYAN, A.S. Effects of sumithion on the histological changes of spotted murrel, *Channa punctatus* (Bloch). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, New York, v.4, n°10, p.1288-1290, 2001.

BRUNET, R et al. Comparative study of the signs of intoxication and changes in activity level of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) exposed to dimethoate. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Charlottetown, vol 64, n. 3, p. 201-209, 1997.

BRUNET, R.; MCDUFF, J. Recovery of brain cholinesterases of brown-headed cowbirds from organophosphorus intoxication effect of environmental temperature. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 59, n. 2, p. 285-291, 1997.

CARLTON, F.B et al. The organophosphate and other insecticides. In: HADDAD, L.M., SHANNON, M.W., WINCHESTER, J.F. **Clinical management of poisoning and drug overdose**. 3.ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998. 850 p.

DAY, B.L. et al. Immunopathology of 8-week-old ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*) exposed to malathion DE, **Environmental Toxicology and Chemistry**, Lawrence, v. 14, n. 10, p. 1719-1726, 1995.

DMOWSKI, K. Birds as bioindicators of heavy metal pollution: review and examples concerning European species. **Acta Ornithologica-Polska Akademia Nauk**, Warszawa, v. 34, p. 1-25. 1999.

DONATELLI, R. J. Biologia reprodutiva da *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847) (Aves: Columbiformes) na região sudoeste do Brasil. **Publicações Avulsas do Instituto Pau-Brasil de História Natural**, Arujá, v.3, p.1-9, 2000.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: CASARETT, L J., KLASSEN, L. DOULLS, P . **Toxicology: the basic science of poisons**. 5^a ed. McGraw-Hill, 1996. 482p.

FORBES N. A. Avian information: avian pathology. **Lansdown Veterinary Surgeons**, Wallbridge, v.3, p. 1-8, 2001.

GOOD, N. E. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, Wayne, v. 5, p. 467, 1966.

GRACZYK, S. et al. Examination of hematological and metabolic changes mechanisms of acute stress in turkeys. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Cracow, v. 6, n 1, p. 1-8, 2003.

GROMYSZ-KALKOWSKA, K.; SZUBARTOWSKA, E. Evaluation of fenitroton toxicity to *Ranna temporaria* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 50, p.116-124, 1993.

GROVE, R. A. et al. Declining ring-necked pheasants in the Klamath Basin, California: I. Insecticide exposure. **Ecotoxicology**, Berlin, v. 7, n. 5, p. 305-312, 1998.

GUILHERMINO, L. et al. Effects of cadmium and parathion exposure on hematology and blood biochemistry of adult male rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 60, p.52-59, 1998.

HENDERSON, R. F. et al Response of rats to low levels of sarin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Orlando, v.184, p. 67-76, 2002.

HUSSAIN, M. A. Anticholinesterases prooperties of methamidophos and acephate in insects and mammals. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 38, p.131-138, 1987.

IBRAHIM N. A. et al. Effect of diazinon, an organophosphate insecticide, on plasma lipid contituents in experimental animals, **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, v. 36, n 5, p. 499-504, 2003.

JAIN, N. C. **Schalm`s veterinary hematology**. 4th ed, Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 572p.

JOKANOVIC, M. Studies on the delayed neuropathic and antilcholinesterase potential of quinalphos (diethyl 2-quinoxalyl phosphorothionate) in hens. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 13, n. 5, p. 337-339, 1993.

JOKANOVIC, M et al. Interaction of phosphamidon with neuropathy target esterase and acetylcholinesterase of hen brain. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 69, n. 6, pp.425-428, 1995.

JUAREZ, L.M.; SANCHES, J. Toxicity of the organophosphorus insecticide metamidophos (O,S-dimethyl phosphoramidotioate) to larvae of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) and the blue shrimp *Panaeus stylirostris* Stimpson. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 43, p. 302-309, 1989.

KIDD, H.; JAMES, D. **Agrochemicals handbook**. 3 ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. 387p.

LARINI, L. Inseticidas. In: LARINE, L. **Toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Editora Manole, 1993. 213p.

MACHEMER, L. H. e PICKEL, M. Carbamates insecticides. **Toxicology**, v. 91, p. 29-36, 1994.

MANDAL, A.; LAHIRI,. P. Hematological responses to sumithion (fenitrothion) in the bluerock pigeon *Columba livia* Gmelin. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 23, n. 12, p. 702-5, 1985.

MATTOCK, H. **Pesticides residues in food**. Geneva: World Health Organization, 2003. 307p.

MEISTER, R.T. **Farm chemicals handbook`95**. Willoughby: Meinster Publishing Company, 1995. 402p.

MINEAU-PIERRE, M.R. et al. Poisoning of raptors with organophosphorus and carbamate pesticides with emphasis on Canada, U. S and UK. **Journal of Raptor Research**, West Chester, v. 33, n. 1, p. 1-37, 1999.

MORGAN, D.P. **Enviromental protection agency recognition and management of pesticides poisonings**. 4. ed., Washington: EPA, 1989. 187 p.

NAGEL, P. et al. Use of feral pigeon eggs for urban biomonitoring. **Fresenius Environmental Bulletin**, Freising, v. 10, n. 1, p. 18-25, 2001.

NAGELE, V. et al. Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.22, p. 165-174, 1984.

NAMBA, T. et al. Poisoning due to organophosphate insecticides: acute and chronic manifestations. **The American Journal of Medicine**, New York, v.50, p. 475-492, 1971.

NENTWICH, K.; PAULUS, M. Biomonitoring with the eggs of feral pigeons: a long term study. **Umweltwissenschaften und Schadstoff Forschung**, Justus-von-Liebig, v.11, n. 5, p. 281-287, 1999.

OKAWA, H. et al. Custos do afugentamento da pomba amargosa *Zenaida auriculata*, na cultura da soja, no médio Paranapanema, safra 1998/1999. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 112-117, 2001.

PARSONS, K.C. et al. **Sublethal effects of exposure to cholinesterase-inhibiting pesticides**: humans and vertebrate wildlife. Manomet: Manomet Center for Conservation Sciences, 2005. 116p.

RAINWATER, T.R. et al. Avian exposure to organophosphorus and carbamate pesticides on a coastal South Carolina golf course. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 14, n. 12, p. 2155-2161, 1995.

RANVAUD, R. et al. Diet of eared doves (*Zenaida auriculata*, Aves, Columbidae) in a sugar cane colony in south-eastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.61, n. 4, p. 651-660, 2001.

RESANOVIC, R et al. T. Toxic effects of organophosphorus compound (dichlorvos) in hens. **Nauka-u-zivinarstvu**, Yugoslavia, v. 1, n. 1-2, p. 47-53, 1996.

RODRIGUES E. N. Situation study of pest-birds in Uruguay (*Zenaida auriculata*, *Columba picazuro*, *Myiopsitta monachus*). In: NINTH LATIN AMERICAN CONGRESS ON ZOOLOGY, 9.,1983, Lima. Proceedings...Lima: Sociedad Entomologica del Peru, 1983.p. 161-168.

SAADEH, A M. et al. Clinical and sociodemographic features of acute carbamate and organophosphate poisoning: a study of 70 adult patients in North Jordan. **Clinical Toxicology**, New York, v. 34, n.1, p. 45-51, 1996.

SAS. SAS User`s guide: statistics. Cary: SAS Institute Inc, 2003. 222 p.

SHARMA, L.L. et al Furadan SP50 induced haematological responses of blue-rock pigeon, *Columba livia* Gmelin. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 61, p. 297-302, 1998.

SHARMA, L.L.; SAXENA. P.N. Carbaryl induced haematological changes in *Columba livia* Gmelin. **Journal of Environmental Biology**, Vikas Nagar, v. 18, n. 1, p. 17-22, 1997.

SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999. 646p.

TAJENDRA, G.S. Gill, liver, and kidney lesions associated with experimental exposures to carbaryl and dimethoate in the fish (*Puntius conchoni* Ham.). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 41, p.71-78, 1988.

TARRANT, K.A. et al. Biochemical and histological effects of the aphicide demeton s-methyl on house sparrows (*Passer domesticus*) under field conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 48, p.360-366, 1992.

TARRANT, K.A. et al. Laboratory evaluation of the hazard to wood mice, *Apodemus sylvaticus*, from the agricultural use of methiocarb molluscicide pellets, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 40, p.147-152, 1988.

WESTLAKE, G.E. et al. Biochemical and histological effects of diclofop-methyl in mice and voles under laboratory conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 40, p.153-158, 1988.

WOLFE, M.F.; KENDALL, R.J. Age-dependent toxicity of diazinon and terbufos in European starlings (*Sturnus vulgaris*) and red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 7, n. 7, p. 1300-1312, 1998.

ZINKL, J.G. et al. Fenthion poisoning of wading birds. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.17, n.1, p. 117-119, 1981.