

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA

**Efeito da emulsão lipídica intravenosa, e sua associação com
diazepam, em coelhos**

Stephanie Elise Muniz Tavares Branco

Belo Horizonte

2020

Stephanie Elise Muniz Tavares Branco

Efeito da emulsão lipídica intravenosa, e sua associação com diazepam, em coelhos

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
para a obtenção de grau de Doutora em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marília Martins Melo
Coorientador: Prof. Dr. Benito Soto-Blanco
Coorientador: Prof. Dr. Rubens Antônio Carneiro
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Suzane Lilian Beier

Belo Horizonte

2020

Branco, Stephanie Elise Muniz Tavares. 1987–
B816e Efeito da emulsão lipídica intravenosa, e sua associação com diazepam, em
coelhos/ Stephanie
Elise Muniz Tavares Branco- 2020.
142f:il.

Orientadora: Marília Martins Melo
Tese (Doutorado) – Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas
Gerais.
Área de concentração: Ciência Animal.
Bibliografia: f: 133 – 142.

1. Coelhos - Teses - 2. Intoxicação - Teses – 3. Ciência Animal – Teses – I.
Universidade
Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – II. Título.

CDD – 636.089

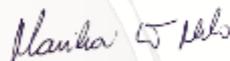
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

STÉPHANIE ELISE MUNIZ TAVARES BRANCO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 31 de março de 2020, pela banca constituída pelos membros:



Dr.(a). Marília Martins Melo
Presidente – Orientador(a)



Dr.(a). Felipe Pierezan

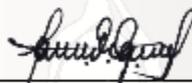


Dr.(a). Vitor Marcio Ribeiro



Dr. Bernardo de Caro Martins
Neurologista
CRM-192.2077

Dr.(a). Bernardo de Caro Martins



Dr.(a). José Eduardo Gonçalves

“No, it won't all go the way it should, but I know the heart of life is good”.

John Clayton Mayer

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelas inúmeras bênçãos que me permitiram chegar até aqui.

À minha comissão de orientação. Ao Prof. Rubens, que com tanto carinho me ensinou desde a graduação. Orientador que se tornou amigo, meu “pai da veterinária”. Tantos conselhos, palavras de apoio, risadas. Obrigada pelo exemplo de amor à “Clínica Soberana”. Ao Prof. Benito, que fez a sugestão que nos levou ao projeto final. À Profa. Suzane, que com muita disponibilidade me ajudou no desenvolvimento e execução do projeto, buscando formas de obtermos os melhores resultados com a manutenção do bem-estar animal.

À Profa. Marília: minha “orientadora-mãe”! Obrigada por ter confiado em mim, apoiado minhas ideias e me orientado enquanto, ao mesmo tempo, me dava espaço para crescer. Você acreditou em mim quando eu mesma duvidava, me corrigiu quando necessário, mas também abriu os braços quando eu precisava. Rezou pela minha família nos momentos mais difíceis, me indicou livros que me transformaram. Me fez apaixonar pela Toxicologia Clínica e me fez acreditar no meu potencial. Obrigada pelos últimos 6 anos, e espero que saiba que sempre te levarei como um grande exemplo. Tenho orgulho de ter sido sua orientada!

À minha “banca dos sonhos”. Todos tão empenhados e dispostos em me auxiliar. Ao Prof. Vitor, exemplo de dedicação à prática clínica juntamente com a pesquisa. Obrigada pelas sugestões tão válidas. Ao Prof. Felipe por toda ajuda nas análises histológicas, e por sempre nos receber com tanta atenção e bom humor. Ao Prof. José Eduardo, como disse tantas vezes, por ter sido “um anjo” que encontramos. Não sei como te agradecer por ter aberto as portas do LCQ, por acreditar no meu projeto, pelos dias longos em que se dedicava tanto, e por tornar o trabalho tão agradável. Obrigada por me ensinar tanto, não somente as técnicas de processamento e do HPLC, mas o amor à pesquisa e a verdadeira entrega pela Educação. E ao Prof. Bernardo, meu amigo, irmão, minha referência na Neurologia Veterinária. Obrigada pelas inúmeras horas discutindo casos clínicos, sugerindo abordagens, abrindo as portas do seu consultório para me ensinar. Obrigada pelo contínuo exemplo do tipo de profissional que almejo ser.

À melhor equipe! Sem vocês teria sido impossível realizar esse projeto. Às ICs Thalita, Kai, Marina, Jéssica, Michelle, Ana e Paula. Se empenharam continuamente na manutenção do

bem-estar animal, sempre interessadas. À toda a equipe da Toxicologia que de alguma forma contribuiu, meu muito obrigada!

À Renata e ao Marcos, que se doaram tanto para a execução deste projeto, sempre disponíveis e tornando o ambiente muito mais agradável e leve. Não sei como expressar a gratidão que tenho por ter tido vocês ao meu lado.

À minha eterna dupla! Matheus, obrigada por sempre estar disposto, e com tanta prontidão me ajudar. Obrigada por me fazer rir nos momentos de estresse, e por sempre ter o maior sorriso enquanto trabalhávamos. Te devo muito!

À Leimar, Valéria, Natália e Sóstenes pela paciência e disponibilidade em me ensinar.

À Mariana (Meni), que com tanta doçura me ajudou em todas as análises hematológicas. Obrigada por me fazer acreditar que “tudo vai dar certo”. Obrigada pelos abraços e conselhos.

À toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas da EV-UFMG, e ao Prof. Raphael pelas análises estatísticas, meu muito obrigada!

Aos meus amigos, essenciais para que conseguisse terminar mais essa fase (não vou conseguir citar todos, mas vocês sabem quem são).

Aos “Residentes Doutorandos”, juntos há 8 anos! Obrigada pelas palavras de apoio, incentivo e tantos momentos de descontração. Ana, obrigada pela amizade que aumenta a cada dia, pelas mensagens sempre que eu mais precisava. Pela confiança em cada convite para dar aula. Pelo “nós vamos conseguir” quando eu tanto duvidava, e pelas horas compartilhando tantas situações inusitadas. Obrigada por entrar na equipe da Toxicologia e se tornar um exemplo tão grande de profissionalismo. Ronald, obrigada por me fazer rir em cada encontro, com seu mal humor tão bem humorado. Por cada conversa que terminava com “mas vai dar certo”.

Ao Quadri, irmãos que a veterinária me deu. Obrigada por sempre me apoiarem e incentivarem, por cada encontro, cada palavra de carinho, cada torcida. Gui, obrigada por ser meu eterno R2! Bela, obrigada por tantas orações, pelas conversas de madrugada, por ter se tornado essencial.

Aos amigos Jéssica, Maria Paula, Ana Flávia, Gabs, Maria Elvira, Aline, Gabi, Karina, Karine, Mayara, Mônica, Naiara, Rafael, Bruno, Pedro, Luiz Paulo, Renato, Thais, Martha, Bruno Torres, Aninha, Júlia e Carol. Obrigada por tantos anos de torcida e apoio.

Aos amigos e funcionários do Hospital Veterinário da UFMG, deixo a minha gratidão pela disposição em sempre ajudar.

À Yuni e à Jenny, obrigada por me fazerem ser uma veterinária melhor. Obrigada por serem as mais companheiras. Sinto falta de vocês todos os dias.

Aos professores que contribuíram para a minha formação, obrigada por se entregarem com tanto amor e dedicação ao ensino.

À minha maior força: minha família. Aos meus pais: poucos sabem o quanto vocês sacrificaram e lutaram para que pudéssemos ter uma boa educação. Obrigada por cada noite em claro rezando por mim, por sonhar junto comigo, por me estimularem a fazer o meu melhor. Obrigada pelos ensinamentos de esforço e ética. Obrigada por serem os meus maiores e melhores exemplos. Às minhas irmãs, minhas melhores amigas. Sempre quis ser como vocês “quando crescesse”, queria ser motivo de orgulho para vocês. Duas mulheres com corações gigantes, que até hoje cuidam de mim, extremamente competentes, que me levam para mais perto de Deus. Eu não sei o que faria sem vocês! “LYMTLIS”! Aos meus 5 anjinhos, que me fazem querer trabalhar cada dia mais para ajudá-los a realizar seus sonhos. Os que me acalmam com um sorriso, ou um simples “titia”. Amo vocês com todo o meu coração! À toda a minha família, pelas orações, apoio, torcida, e por entender minha ausência em alguns momentos. Às minhas avós, Irene e Esther, e aos meus padrinhos, Tia Neuza e Tio Nico.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse mais esta etapa, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE QUADROS.....	16
LISTA DE ABREVIACOES	17
RESUMO.....	19
<i>ABSTRACT</i>	20
INTRODUÇÃO	21
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	25
1.1 EMULSÃO LIPÍDICA INTRAVENOSA	25
1.1.1 FORMULAÇÃO.....	25
1.1.2 METABOLISMO E BIOTRANSFORMAÇÃO	26
1.1.3 DISTRIBUIÇÃO	29
1.1.4 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ÁCIDOS GRAXOS E ELIMINAÇÃO	29
1.1.5 A EMULSÃO LIPÍDICA INTRAVENOSA NA TOXICOLOGIA.....	30
1.1.6 MECANISMOS DE AÇÃO	32
1.1.7 INDICAOES.....	34
1.1.8 PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO	36
1.1.9 EFEITOS COLATERAIS	38
1.2 DIAZEPAM	42
1.2.1 ABSORÇÃO E BIODISPONIBILIDADE	42
1.2.2 LIGAÇÃO S PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	43
1.2.3 EFEITO CLÍNICO E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA	44
1.2.4 BIOTRANSFORMAÇÃO	45
1.2.5 DISTRIBUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO TECIDUAL	46
1.2.6 ELIMINAÇÃO	50
CAPÍTULO 2: EFEITOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA EMULSÃO LIPÍDICA INTRAVENOSA, E DA SUA ASSOCIAÇÃO AO DIAZEPAM, EM COELHOS HÍGIDOS.....	52
2.1 INTRODUÇÃO	52
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.2.1 GRUPOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	53
2.2.2 ANÁLISES CLÍNICAS.....	56
2.2.2.1 AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA.....	56

2.2.2.2 ANÁLISES LABORATORIAIS	58
2.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
2.3.1 AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA	60
2.3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA GERAL	65
2.3.2.1 TEMPERATURA RETAL, TEMPERATURA DA PELE E DELTA-T ..	65
2.3.2.2 FREQUÊNCIA CARDÍACA	69
2.3.2.3 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA, PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA E PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA	70
2.3.3 HEMOGASOMETRIA	75
2.3.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA	86
2.3.4.1 PROTEÍNA TOTAL E ALBUMINA	87
2.3.4.2 UREIA E CREATININA	89
2.3.4.3 ALANINA AMINOTRANSFERASE, ASPARTATO AMINOTRANSFERASE, FOSFATASE ALCALINA E GAMA GLUTAMIL TRANSFERASE	90
2.3.4.4 TRIGLICÉRIDES, COLESTEROL E AMILASE	93
2.3.4.5 GLICOSE	97
2.3.5 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	98
2.3.5.1 ERITROGRAMA	98
2.3.5.1.1 HEMATÓCRITO, CONTAGEM TOTAL DE HEMÁCIAS E CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA	99
2.3.5.1.2 CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA, HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA E VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO	101
2.3.5.2 LEUCOGRAMA	102
2.3.5.3 AVALIAÇÃO DAS PLAQUETAS	104
2.3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	105
2.3.6.1 PULMÃO	106
2.3.6.2 FÍGADO	107
2.3.6.3 PÂNCREAS	109
2.3.6.4 RIM	111
2.4 CONCLUSÕES	111
3. INTERFERÊNCIA DA EMULSÃO LIPÍDICA INTRAVENOSA NAS ANÁLISES LABORATORIAIS	112
3.1 REVISÃO DE LITERATURA	112
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	114
3.2.1 GRUPOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	114

3.2.2 ANÁLISES LABORATORIAIS	116
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.3.1 HEMOGASOMETRIA	117
3.3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS SÉRICAS	117
3.3.3 ANÁLISES ERITROCITÁRIAS	121
3.3.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	121
3.3.4.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	121
3.3.4.2 DETERMINAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO (PRÉ- TRATAMENTO)	123
3.3.4.3 LINEARIDADE E REPETIBILIDADE DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUECHERS	127
3.3.4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE COELHOS TRATADOS COM ELI	129
3.4 CONCLUSÕES	131
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	132
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Gotículas de lipídios dentro dos hepatócitos de ratos tratados com emulsão lipídica (Intralipid®).	28
Figura 1.2	Vias de biotransformação dos principais metabólitos do DZ.	45
Figura 2.1	Linha do tempo dos procedimentos experimentais realizados.	55
Figura 2.2	Coelho em decúbito lateral, com estado mental deprimido e ausência do reflexo de endireitamento após administração de DZ (1,0 mg/kg, IV).	61
Figura 2.3	Gráfico da progressão da pontuação total obtida durante a avaliação do animal A53 em comparação com as medianas dos grupos DZ, DZxR e DZxELI.	63
Figura 2.4	Média e desvio padrão da PAS (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	71
Figura 2.5	Média e desvio padrão do pH em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	76
Figura 2.6	Média e desvio padrão do BEefc em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	79
Figura 2.7	Média e desvio padrão da pCO ₂ (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	80
Figura 2.8	Média e desvio padrão da concentração de lactato (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	84
Figura 2.9	Média e desvio padrão da concentração de K (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	85
Figura 2.10	Amostras coletadas de coelho Nova Zelândia e transferidas para tubo sem anticoagulante após a administração de ELI 20% em <i>bolus</i> de 1,5 mL/kg seguido de 0,25 mL/kg/min durante 30 minutos.	94
Figura 2.11	Degeneração vacuolar multifocal mínima em artéria pulmonar de coelho.	107
Figura 2.12	Degeneração vacuolar hepática de diferentes graus em coelhos.	108
Figura 2.13	Degeneração vacuolar multifocal mínima em pâncreas de coelho do grupo DZxELI.	109
Figura 2.14	Microscopia eletrônica de transmissão em amostras pancreáticas de coelho.	110
Figura 3.1	Linha do tempo dos procedimentos experimentais realizados.	116
Figura 3.2	Cromatograma de solução do PI BZ (10 µg/mL) e de DZ (0,5 µg/mL) em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 35 ACN : 35 MEOH : 30 H ₂ O a um fluxo de 1,0 mL/min.	123

- Figura 3.3** Cromatograma de soro de coelho do grupo DZxELI, coletado no momento T1, enriquecido com PI e extraído em coluna de SPE, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 40 ACN : 40 MEOH : 20 TF a um fluxo de 1,0 mL/min. **125**
- Figura 3.4** Cromatograma de soro de coelho enriquecido com PI, DZ e ELI, submetido à extração líquido-líquido em coluna de SPE, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 40 ACN : 40 MEOH : 20 TF a um fluxo de 1,0 mL/min. **126**
- Figura 3.5** Cromatograma de soro de coelho enriquecido com PI, DZ e ELI, extraído por QuEChERS adaptado, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 30 ACN : 30 MEOH : 40 TF a um fluxo de 1,0 mL/min. **127**
- Figura 3.6** Cromatogramas de soro de coelho enriquecido com PI, DZ e ELI, extraído por QuEChERS adaptado, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 30 ACN : 30 MEOH : 40 TF a um fluxo de 1,0 mL/min. **128**
- Figura 3.7** Cromatogramas de soro de coelho do grupo DZxELI enriquecido com PI, extraído por QuEChERS adaptado, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 30 ACN : 30 MEOH : 40 TF a um fluxo de 1,2 mL/min. **129**
- Figura 3.8** Cromatogramas de soro de coelho do grupo ELI enriquecido com PI, extraído por QuEChERS adaptado, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 30 ACN : 30 MEOH : 40 TF a um fluxo de 1,2 mL/min. **130**

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Mediana (md), valor mínimo (mín) e valor máximo (máx) da pontuação total obtida durante avaliação neurológica dos coelhos dos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R em cada tempo (T0 a T5).	60
Tabela 2.2	Média e desvio padrão da TR (°C) em T0 a T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	66
Tabela 2.3	Média e desvio padrão da TP (°C) em T0 a T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	67
Tabela 2.4	Média e desvio padrão de Delta-T (°C) em T0 a T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	68
Tabela 2.5	Média e desvio padrão da FC (bpm) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	69
Tabela 2.6	Média e desvio padrão da PAS (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	71
Tabela 2.7	Média e desvio padrão da PAD (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	72
Tabela 2.8	Média e desvio padrão da PAM (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	73
Tabela 2.9	Média e desvio padrão do pH em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	76
Tabela 2.10	Média e desvio padrão dos níveis de HCO ₃ ⁻ (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	78
Tabela 2.11	Média e desvio padrão do BE _{efc} em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	78
Tabela 2.12	Média e desvio padrão da pCO ₂ (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	80
Tabela 2.13	Média e desvio padrão da pO ₂ (mmHg) e sO ₂ (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	81
Tabela 2.14	Média e desvio padrão do AnGap (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	83
Tabela 2.15	Média e desvio padrão dos níveis de lactato (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	83
Tabela 2.16	Média e desvio padrão da concentração sanguínea de K ⁺ (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	84
Tabela 2.17	Média e desvio padrão das concentrações sanguíneas de iCa (mmol/L), Cl ⁻ (mmol/L) e Na ⁺ (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	86

Tabela 2.18	Média e desvio padrão dos níveis séricos de PT (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	88
Tabela 2.19	Média e desvio padrão dos níveis séricos de albumina (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	88
Tabela 2.20	Média e desvio padrão dos níveis séricos de ureia (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	89
Tabela 2.21	Média e desvio padrão dos níveis séricos de creatinina (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	90
Tabela 2.22	Média e desvio padrão da atividade da AST (UI/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	91
Tabela 2.23	Média e desvio padrão da atividade da ALT (UI/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	92
Tabela 2.24	Média e desvio padrão da atividade da FA (UI/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	92
Tabela 2.25	Média e desvio padrão da atividade da GGT (UI/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	93
Tabela 2.26	Média e desvio padrão dos níveis séricos de TG (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	94
Tabela 2.27	Média e desvio padrão dos níveis séricos de colesterol (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	95
Tabela 2.28	Média e desvio padrão da atividade de amilase (UI/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	97
Tabela 2.29	Média e desvio padrão dos níveis séricos de glicose (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	97
Tabela 2.30	Média e desvio padrão do HTC (%) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	99
Tabela 2.31	Média e desvio padrão da RBC ($\times 10^6$ células/ μ L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	100
Tabela 2.32	Média e desvio padrão da HB (g/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	100
Tabela 2.33	Média e desvio padrão do HCM (pg) e CHCM (g/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	101
Tabela 2.34	Média e desvio padrão do VCM (fL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	101
Tabela 2.35	Média e desvio padrão dos leucócitos totais ($\times 10^3$ células/ μ L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	102
Tabela 2.36	Média e desvio padrão da contagem de linfócitos ($\times 10^3$ células/ μ L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	103

Tabela 2.37	Média e desvio padrão da contagem de neutrófilos ($\times 10^3$ células/ μL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	103
Tabela 2.38	Média e desvio padrão da contagem total de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1	Razão corrigida entre a concentração de DZ nos tecidos e no plasma arterial após administração IV única de 1,2 mg/kg de DZ em ratos.	47
Quadro 2.1	Diferentes desafios e tratamentos realizados em cada grupo experimental.	54
Quadro 2.2	Comparação da osmolaridade (mOsm/L) e do pH entre as soluções de Lipovenos [®] MCT 20%, Ringer Lactato e Cloreto de Sódio (0,9%).	56
Quadro 2.3	Ficha de pontuação neurológica adaptada de BAKER et al. (1991) e RAEKALLIO et al. (2002).	57
Quadro 2.4	Intervalo de referência da TR, FC, PAS, PAD e PAM em coelhos.	65
Quadro 2.5	Intervalo de referência do pH, pCO ₂ , HCO ₃ ⁻ , pO ₂ , sO ₂ , BE _{efc} , AnGap, lactato, K ⁺ , Na ⁺ , iCa ⁺ e Cl ⁻ em coelhos.	75
Quadro 2.6	Intervalo de referência da PT, albumina, ureia, creatinina, ALT, AST, FA, GGT, TG, colesterol, amilase e glicose em coelhos.	87
Quadro 2.7	Intervalo de referência do HCT, RBC, HB, CHCM, HCM, VCM, leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e plaquetas em coelhos.	98
Quadro 2.8	Ficha de pontuação da avaliação histológica de pulmão, fígado e pâncreas em coelhos.	105
Quadro 3.1	Diferentes desafios e tratamentos realizados em cada grupo experimental.	115
Quadro 3.2	Método de avaliação dos analitos, concentração mínima de TG necessária para gerar interferência, e comprimento de onda em que a leitura destes é realizada segundo as instruções de uso dos reagentes (Kovalent [®]).	118

LISTA DE ABREVIACÕES

ACN – Acetonitrila.

AL – Anestésico local.

ALT – Alanina aminotransferase.

AnGap – Ânion gap.

AST – Aspartato aminotransferase.

BE_{efc} – Excesso de base do líquido extracelular.

BZ – Bromazepam.

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média.

Cl⁻ – Cloro.

Co – Concentração plasmática máxima.

CO₂ – Dióxido de carbono.

DAD – Dano alveolar difuso.

DMDZ – Desmetildiazepam.

DZ – Diazepam.

ELI – Emulsão lipídica intravenosa.

FA – Fosfatase alcalina.

FC – Frequência cardíaca.

FiO₂ – Fração de oxigênio inspirado.

FM – Fase móvel.

GABA – Ácido gama amino butírico.

GGT – Gama-glutamil transferase.

H⁺ – Íon hidrogênio.

HB – Concentração de hemoglobina.

HCM – Hemoglobina corpuscular média.

HCO₃⁻ – Íon bicarbonato.

HCT – Hematócrito.

HDL – Lipoproteína de alta densidade.

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance.

iCa – Cálcio ionizado.

IM – Intramuscular.

IN – Intranasal.

ISE - Eletrodo íon-seletivo.
IV – Intravenoso.
 K^+ – Potássio.
LCE - Líquido cérebro-espinhal.
LCT – Triglicérides de cadeia longa
LDL – Lipoproteína de baixa densidade.
LPL – Lipoproteína lipase.
LP-X - Lipoproteína-X.
MCT – Triglicérides de cadeia média.
MEOH – Metanol.
 Na^+ – Sódio.
NPT – Nutrição parenteral total.
PAD – Pressão arterial diastólica.
PAM – Pressão arterial média.
PAS – Pressão arterial sistólica.
 pCO_2 – Pressão parcial de dióxido de carbono.
pH – Potencial hidrogeniônico.
PI – Padrão interno.
 pO_2 – Pressão parcial de oxigênio.
PT – Proteína total.
RBC – Contagem total de hemácias.
SARA – Síndrome da angústia respiratória aguda.
SNC – Sistema nervoso central.
 sO_2 – Saturação de oxigênio.
SPE – Extração em fase sólida.
TF – Tampão fosfato.
TG – Triglicérides.
TP – Temperatura da pele.
TPC – Tempo de reperfusão capilar.
TR – Temperatura retal.
UV – Ultravioleta.
VCM – Volume corpuscular médio.
 V_d – Volume de distribuição.
VO – Via oral.

RESUMO

As emulsões lipídicas intravenosas (ELI) estão sendo utilizadas no tratamento de intoxicações por anestésicos locais e outros fármacos lipofílicos. O mecanismo preciso pelo qual essa terapia apresenta benefício ainda não é completamente compreendido, mas acredita-se que há envolvimento de efeito de partição e modulação farmacocinética. A abrangência do efeito de partição sugere a possibilidade de interação entre a ELI e outros fármacos lipofílicos administrados terapeuticamente, como o diazepam (DZ). Uma vez que o DZ é lipofílico, é possível que o uso da ELI interfira na sua distribuição e, conseqüentemente, no seu efeito clínico, porém a modulação farmacocinética da infusão lipídica sobre este fármaco ainda não foi determinada. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito clínico da terapia com ELI em coelhos medicados com DZ e a segurança desta terapia. Foram utilizados 30 coelhos Nova Zelândia machos, adultos, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=6). Três grupos receberam DZ (1,0 mg/kg, IV). Destes, um não recebeu qualquer tratamento, enquanto os outros dois foram tratados com ELI (Lipovenos® MCT 20%) ou ringer com lactato (*bolus* inicial de 1,5 mL/kg seguido de infusão contínua na taxa de 0,25 mL/kg/min durante 30 minutos). O quarto grupo recebeu somente a infusão de emulsão, enquanto o quinto recebeu somente ringer com lactato. Estes animais foram submetidos a sucessivos exames neurológicos, exames físicos gerais e monitoração da pressão arterial durante 100 minutos. Amostras de sangue foram coletadas para realização de hemogasometria, análise hematológica e bioquímica sérica. Ao final do experimento, todos os animais foram eutanasiados e a necropsia foi imediatamente realizada, com coleta de amostras teciduais de pulmão, rim, fígado e pâncreas para análise por microscopia óptica e eletrônica. Concluiu-se que a emulsão lipídica não interferiu no efeito sedativo do DZ, e não causou efeitos clínicos adversos, apesar de transitória acidose metabólica, sendo o protocolo utilizado considerado seguro.

Palavras-chave: Intoxicação, lipofílico, benzodiazepínicos, antídoto.

ABSTRACT

Intravenous lipid emulsions (ILE) are being used to reverse intoxications by local anesthetics and other lipophilic drugs. The precise mechanism by which this therapy acts in intoxications is not completely understood, but it is believed that there is a partition effect and pharmacokinetic modulation. On the other hand, the partition theory suggests that an interaction between ILE and other therapeutically administered lipophilic drugs, such as diazepam (DZ), is possible. Since DZ is a lipophilic drug, it is possible that the use of ILE interferes with its distribution and, consequently, clinical effect, however the pharmacokinetic modulation of ILE on it has not been determined. The aim of this study was to evaluate the clinical effect of ILE therapy in rabbits medicated with DZ, and assess if the protocol used was safe. Thirty adult male New Zealand rabbits were used and randomly allocated to five groups (n=6). Three groups received DZ (1,0 mg/kg, IV). One of them did not receive any treatment, while the other two were treated with ILE (Lipovenos® MCT 20%) or lactated ringer solution (initial bolus of 1.5 mL/kg followed by continuous infusion at the rate of 0.25 mL/kg/min for 30 minutes). The fourth group only received lipid emulsion, while the fifth received only lactated ringer solution. All animals were submitted to successive routine exams, neurological exams and arterial blood pressure monitoring for 100 minutes. Blood samples were collected for hematological, serum biochemical and blood gas analysis. At the end of the experiment, all animals were euthanized, and necropsy was immediately performed. Tissue samples from lung, kidney, liver and pancreas were collected for optical and electron microscopy analysis. It was concluded the ILE did not interfere with DZ's sedative effect, or cause significant adverse effects, despite transitory metabolic acidosis, and the protocol used was considered safe.

Key-words: Intoxication, lipophilic, benzodiazepines, antidote.

INTRODUÇÃO

A emulsão lipídica intravenosa (ELI) é utilizada há mais de 50 anos na alimentação parenteral para fornecimento de ácidos graxos essenciais e suplementação calórica, podendo ter diferentes formulações. Ela também é utilizada como carreador de substâncias pouco solúveis, como o propofol (CAO et al., 2015; DRISCOLL, 2006).

Após o relato de sucesso da utilização da ELI em um homem com parada cardíaca causada pela bupivacaína em 2006, essa emulsão tem sido cada vez mais usada no tratamento de intoxicações por anestésicos locais (AL) e outras drogas e fármacos lipofílicos neuro e cardiotoxicos (CAO et al., 2015; FERNANDEZ et al., 2011; HARVEY; CAVE, 2008; LITZ et al., 2008; ROSENBLATT et al., 2006; TURNER-LAWRENCE; KERNS II, 2008; WEINBERG et al., 2006).

Em humanos, intoxicações com depressão do SNC pela ingestão proposital de fármacos é uma causa frequente de internação nos setores de intensivismo. Assim, a possibilidade de uma terapia que possa reverter estes quadros, muitas vezes causados por agentes que não apresentam antídoto, é de grande valia e desperta o interesse na utilização das ELI na clínica toxicológica (KAZEMI et al., 2011).

Apesar do aumento na utilização da ELI no tratamento de intoxicações por agentes lipofílicos, a comprovação científica da sua eficácia em toxicoses por fármacos que não são AL ainda é escassa (LEVINE et al., 2016). Novas investigações podem auxiliar na melhor determinação de quais intoxicações podem ter resposta benéfica à terapia com a ELI, e na definição do protocolo de utilização mais adequado de acordo com a substância envolvida (GWALTNEY-BRANT; MEADOWS, 2018).

O mecanismo preciso pelo qual a ELI aumenta a taxa de recuperação dos pacientes intoxicados não é completamente compreendido, mas o mais citado é um efeito de partição, também conhecido como *lipid sink* ou efeito de sequestro. Ele é baseado na expansão da fase lipídica plasmática, que resultaria na extração de moléculas lipídicas solúveis da fase plasmática aquosa. Com isto, há redução na quantidade do fármaco lipofílico disponível ao tecido onde atuaria, uma vez que permanece no novo compartimento lipídico criado (FERNANDEZ et al., 2011; FETTIPLACE et al., 2015; HARVEY; CAVE; ONG, 2014; HARVEY; CAVE, 2008; KAZEMI et al., 2011; PEACOCK, 2014; SHI et al., 2013; WEINBERG et al., 2003, 1998,

2006). Esta teoria sugere a possibilidade de utilização dessa terapia em intoxicações causadas por uma ampla variedade de fármacos lipossolúveis (CAO et al., 2015).

Por outro lado, foi observado que o efeito de sequestro não explica completamente os benefícios obtidos com a utilização da ELI, sugerindo a participação de outros mecanismos (FETTIPLACE et al., 2014; HARVEY; CAVE; ONG, 2014). A ação de modulação farmacocinética também tem sido amplamente aceita. Esta teoria é uma extensão do efeito de partição, e sugere que a ELI resulta em redistribuição acelerada (CAVE; HARVEY, 2014; FETTIPLACE et al., 2015; FETTIPLACE; WEINBERG, 2018; KAZEMI et al., 2011; LITONIUS et al., 2012; SHI et al., 2013), e favorecimento da saída do fármaco de órgãos susceptíveis em direção a órgãos inertes à toxina, além de eliminação acelerada (CAVE; HARVEY, 2014; FETTIPLACE et al., 2015; FETTIPLACE; WEINBERG, 2018; KAZEMI et al., 2011; SHI et al., 2013). Acredita-se, também, que há contribuição do volume e de um efeito cardiotônico nos mecanismos relacionados com a utilização benéfica da ELI em intoxicações (FETTIPLACE et al., 2014, 2015; HARVEY; CAVE; ONG, 2014).

Segundo estes mecanismos, a ELI pode atuar sobre uma ampla variedade de fármacos, o que sugere a possibilidade de interação não somente com os agentes tóxicos, mas também com fármacos lipofílicos administrados concomitantemente no tratamento dos animais intoxicados. A emulsão possivelmente altera as concentrações e, conseqüentemente, a ação destes fármacos (BATES et al., 2013; CAVE; HARVEY, 2014). Entretanto, a modulação farmacocinética da ELI sobre eles ainda não foi determinada, e mais dados são necessários para confirmar se ela resulta em alteração na eficácia destes fármacos (BATES et al., 2013; CAVE; HARVEY, 2014; GOSSELIN et al., 2016). Nestes casos, a indicação desta terapia deve ser realizada com cautela, levando em consideração os possíveis efeitos deletérios ao tratamento (BATES et al., 2013).

Embora mais estudos clínicos sejam necessários para determinar a segurança e efetividade dessa modalidade terapêutica, relatos e estudos experimentais sugerem que as ELI podem se tornar uma adição valiosa na emergência veterinária (GWALTNEY-BRANT; MEADOWS, 2012). Esta terapia pode permitir, além de maior sobrevivência, redução do tempo de recuperação e de hospitalização dos animais intoxicados. Desta forma, um custo menor é gerado aos proprietários, e animais que seriam eutanasiados por questões financeiras passam a ter uma chance de recuperação (KUROKI; ODUNAYO, 2013).

É importante pontuar que um antídoto deve apresentar uma pequena prevalência de efeitos adversos para que possa ser clinicamente útil, e as emulsões gordurosas têm um bom histórico de segurança baseado na frequência e utilização duradoura na nutrição parenteral total (NPT) (TURNER-LAWRENCE; KERNS II, 2008).

Acredita-se que o protocolo mais adequado para a administração da ELI em intoxicações pode variar com o agente tóxico envolvido e com a espécie acometida, porém em grande parte dos relatos desta terapia na medicina veterinária foi utilizada a emulsão lipídica a 20%, com *bolus* lento seguido de infusão contínua por 30 a 60 minutos (GWALTNEY-BRANT; MEADOWS, 2012). FERNANDEZ et al. (2011) recomendaram em cães a administração de *bolus* de 1,5 a 4,0 mL/kg por via intravenosa (IV) no período de 1 minuto, seguido de infusão na taxa de 0,25 mL/kg/min (IV) durante 30 a 60 minutos.

Relatos sugeriram que o uso da ELI pode ser benéfico no tratamento de intoxicações por agentes lipofílicos como a ivermectina, moxidectina, permetrina e o baclofeno. Todavia, animais intoxicados por estes fármacos também podem apresentar crises epiléticas e ser tratados com antiepiléticos lipossolúveis, como o diazepam (DZ), midazolam, propofol e barbitúricos (BATES et al., 2013; CRANDELL; WEINBERG, 2009; DEGROOT, 2016; EDWARDS; SHIHAB; SCOTT, 2014; KHORZAD et al., 2012; SNOWDEN et al., 2006; VARGA, 2013a). Por serem lipofílicos, é possível que a utilização concomitante da ELI interfira na concentração sanguínea e no efeito destes antiepiléticos. Não há estudos controlados avaliando a ação da ELI sobre os agonistas do GABA, como os barbitúricos, baclofeno, propofol e os benzodiazepínicos (LEVINE et al., 2016).

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a ELI de triglicérides de cadeia média e longa (Lipovenos® MCT 20%) interfere no efeito clínico do DZ, assim como avaliar a segurança desta terapia em associação, ou não, a este benzodiazepínico. Os resultados obtidos também foram utilizados na busca pelo melhor entendimento dos mecanismos de ação das ELI em intoxicações.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito clínico da utilização de ELI em coelhos medicados com DZ, observando se há reversão ou atenuação do efeito sedativo desse fármaco, ou redução do tempo

necessário para recuperação.

- Avaliar se a ELI pode gerar efeitos deletérios nestes animais, causando alterações clínicas, sanguíneas ou teciduais.

- Avaliar se a terapia com ELI altera a concentração plasmática de DZ.

- Avaliar a interferência da lipemia causada pela ELI na hemogasometria e nas análises hematológicas, bioquímicas séricas e de cromatografia a líquido.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 EMULSÃO LIPÍDICA INTRAVENOSA

1.1.1 FORMULAÇÃO

A ELI é utilizada há mais de cinco décadas na alimentação parenteral com o propósito de fornecimento de ácidos graxos essenciais, como o linoleico e α -linoleico, evitando a deficiência desses componentes, e como fonte de energia (aproximadamente 9 kcal/g). A alta densidade calórica das emulsões lipídicas permite que uma quantidade menor de fluido seja necessária, evitando sobrecarga volumosa. Ela também é utilizada como carreador de substâncias pouco solúveis, como o propofol (CAO et al., 2015; CROOK, 2000; DRISCOLL, 2006; WAITZBERG; TORRINHAS; JACINTHO, 2006). Ela é uma emulsão gordurosa, estéril, com diferentes formulações possíveis (BECKER; YOUNG, 2017; DRISCOLL, 2006).

Essas emulsões são compostas por uma fase lipídica dispersa, na forma de gotículas, em uma fase aquosa. As partículas apresentam núcleo constituído primariamente por triglicérides (TG), com natureza hidrofóbica, havendo a necessidade de emulsificante para garantir a estabilidade da emulsão e dispersão do óleo em água. O emulsificante comumente utilizado é a lecitina proveniente da gema do ovo, sendo formado por uma camada única de fosfolipídios com propriedades lipofílicas e hidrofílicas. Estas propriedades permitem a manutenção da gordura em fase aquosa. A utilização de fosfolipídios na estabilização das emulsões lipídicas tem como propósito mimetizar as micelas de gordura naturais (os quilomícrons). As gotículas da emulsão têm formato esférico, tamanho e composição lipídica similar aos quilomícrons, com 200 – 500nm de diâmetro. A tonicidade das emulsões é ajustada com glicerol (CARPENTIER; DUPONT, 2000; DAVIS et al., 1990; HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010; HULTIN et al., 1995; WAITZBERG; TORRINHAS; JACINTHO, 2006).

As primeiras emulsões lipídicas desenvolvidas eram ricas em triglicérides de cadeia longa (LCT) oriundos primariamente dos óleos de soja e cártamo. Óleos de milho e da semente de girassol também foram utilizados. Posteriormente, foi observada maior resposta inflamatória e imunossupressora com as emulsões com altas concentrações de ácido linoleico, e novas formulações foram desenvolvidas com diferentes conteúdos de ácidos graxos poli-insaturados e fontes de origem. As emulsões lipídicas formuladas com a associação do óleo de soja com triglicérides de cadeia média (MCT) ou óleo de azeite apresentam menor quantidade de ácidos graxos ω -6 poli-insaturados (linoleico), com melhor metabolização, e menor resposta

inflamatória e imunossupressora em comparação aos compostos somente com o óleo de soja (WAITZBERG; TORRINHAS; JACINTHO, 2006).

Todas as apresentações comerciais de emulsão lipídica, com concentração oleosa de 10, 20 ou 30%, apresentam quantidade de emulsificador acima do nível necessário, de modo que ocorra cobertura completa da interface óleo/água. Este excesso resulta na formação de estruturas chamadas lipossomos, que em grande quantidade podem ser prejudiciais. Emulsões com maior concentração oleosa tendem a ter menor quantidade de lipossomos. Desta forma, recomenda-se a utilização das emulsões mais concentradas (WAITZBERG; TORRINHAS; JACINTHO, 2006).

Independente da concentração final da emulsão, o tamanho médio dos glóbulos não deve exceder 500nm. A manutenção da distribuição desta característica demonstra a estabilidade e segurança da emulsão, sem a qual as gotículas coalesceriam, com potencial risco ao paciente (DRISCOLL, 2006; FERNANDEZ et al., 2011).

1.1.2 METABOLISMO E BIOTRANSFORMAÇÃO

A metabolização intravascular das partículas ricas em TG, fração da emulsão com características mais próximas aos quilomícrons endógenos, é similar à metabolização dos quilomícrons, porém as emulsões são desprovidas de apoproteínas e ésteres de colesterol, e apresentam maior proporção de TG (CARPENTIER, 1989; CARPENTIER; DUPONT, 2000; CROOK, 2000; HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010).

Logo após a administração IV da emulsão lipídica, as partículas ricas em TG adquirem rapidamente apoproteínas como a apo-E, apo-CI, apo-CII, apo-CIII e apo-AVI, provenientes de lipoproteínas de alta (HDL) e baixa (LDL) densidade. As apoproteínas CII e CIII participam da modulação da ligação das partículas à lipoproteína lipase (LPL) e ativação da lipólise dos TG pela enzima, enquanto CIII e E influenciam a captação celular das partículas e remoção hepática dos remanescentes, necessárias para o reconhecimento pelos receptores de lipoproteínas (CARPENTIER; DUPONT, 2000; HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010; HULTIN et al., 1995).

A ligação à LPL ocorre no endotélio dos vasos de diferentes tecidos periféricos, como no tecido adiposo e em músculos. Pela sua ação, grande parte do núcleo das moléculas de TG é hidrolisado, com a produção de ácidos graxos livres que são captados rapidamente pelos

tecidos adjacentes, armazenados no tecido adiposo, ou liberados para a circulação (CARPENTIER, 1989; CARPENTIER; DUPONT, 2000; HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010; VILARÓ; LLOBERA, 1988; WAITZBERG; TORRINHAS; JACINTHO, 2006). A lipase atua somente nas moléculas lipídicas presentes na interface das lipoproteínas (CARPENTIER, 1989).

No compartimento intravascular, o conteúdo de fosfolipídios e TG das emulsões é continuamente modificado, não somente pela hidrólise, mas também por transferências mediadas por proteínas específicas, reduzindo drasticamente o tamanho das gotículas da emulsão (as partículas da emulsão doam TG e recebem ésteres de colesterol em um processo de troca com lipoproteínas ricas em colesterol – HDL e LDL). As partículas residuais, chamadas de quilomícrons residuais, são mais ricas em colesterol e mais pobres em TG e fosfolipídios. Os remanescentes são identificados por receptores hepáticos específicos e são removidos pelo fígado (CARPENTIER, 1989; CARPENTIER; DUPONT, 2000; HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010; ILLUM et al., 1989).

Há associação entre a redução da função hepática e o aumento na concentração plasmática de lipídios (CARPENTIER, 1989). A ELI sofre metabolização hepática ativa e rápida. Rapidamente, há redução dos TG na circulação sanguínea com concomitante aumento dos TG hepáticos e dos corpos cetônicos circulantes. Os remanescentes da emulsão permanecem mais tempo na circulação (VILARÓ; LLOBERA, 1988).

As partículas lipídicas atravessam a fenestração endotelial hepática, e posteriormente são internalizadas pelos hepatócitos e, principalmente, pelas células endoteliais. A internalização hepática da ELI pode resultar em acúmulo de TG no fígado, como grandes gotículas lipídicas dentro dos hepatócitos (Figura 1.1) (VILARÓ; LLOBERA, 1988).

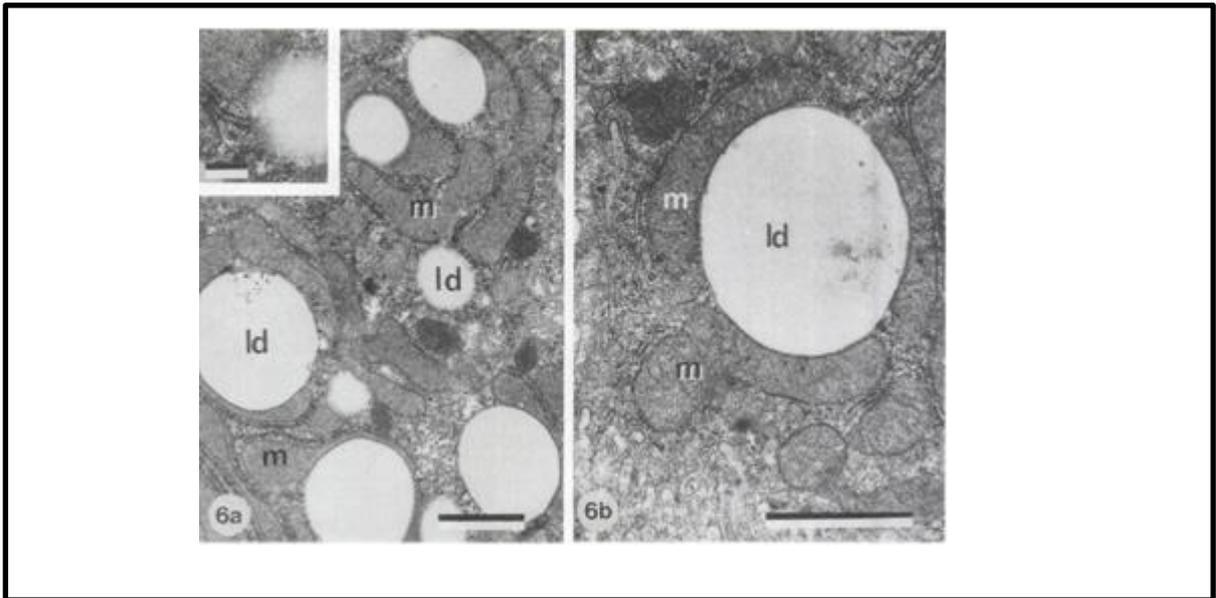


Figura 1.1 - Gotículas de lipídios (ld) dentro de hepatócitos de ratos tratados com emulsão lipídica (Intralipid®). m: mitocôndria (Fonte: VILARÓ e LLOBERA, 1988).

É importante ressaltar que diferenças na composição e no tamanho das gotículas da emulsão podem causar variações no metabolismo. A metabolização depende da interação com a superfície das gotículas, da aquisição de apolipoproteínas, e do reconhecimento pela LPL nas regiões de ligação endotelial e pelos receptores catabólicos (HULTIN et al., 1995).

O excesso de fosfolipídios exógenos utilizados na estabilização das emulsões resulta no segundo tipo de partícula, as partículas ricas em fosfolipídios semelhantes a lipossomos (este excesso é mais frequente em emulsões lipídicas a 10%). Ao se comparar emulsões lipídicas a 10% e a 20%, as primeiras apresentam, para uma mesma quantidade fornecida de TG, duas vezes mais fosfolipídios (CARPENTIER, 1989; CARPENTIER; DUPONT, 2000; WAITZBERG; TORRINHAS; JACINTHO, 2006).

Os lipossomos, em quantidade excessiva ou administrados rapidamente, podem oferecer risco ao paciente. Eles inibem a lipólise dos TG exógenos e estimulam a produção tecidual de colesterol, além de se tornarem partículas com características de lipoproteínas anormais, as lipoproteínas-X (LP-X) (CARPENTIER, 1989; WAITZBERG; TORRINHAS; JACINTHO, 2006).

1.1.3 DISTRIBUIÇÃO

A emulsão lipídica e seus TG pode ser encontrada em diferentes tecidos. Em ratos em jejum, o volume de distribuição (V_d) aparente dos TG provenientes da emulsão foi de 14,8 mL, volume superior ao volume sanguíneo total dos animais (HULTIN et al., 1995).

Vinte minutos após a administração da emulsão lipídica a ratos, somente 40% do núcleo da emulsão foi encontrado no sangue e fígado, estando o restante em tecidos extra-hepáticos. Aproximadamente 12 a 15% dos TG provenientes da emulsão foi encontrado no fígado, 8 a 12% no sangue e aproximadamente 3% no baço. Estes TG também foram encontrados, em menor proporção, no tecido adiposo epididimal, diafragma, pulmão, coração e rins (HULTIN et al., 1995). Coelhos que receberam 1 mL de emulsão lipídica a 10% (óleo de soja emulsificada com lecitina) pela via IV e avaliados por cintilografia gama com iodo apresentaram, 1 hora após a administração, 36% da atividade da ELI na região de fígado e no baço (ILLUM et al., 1989).

1.1.4 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ÁCIDOS GRAXOS E ELIMINAÇÃO

A composição da emulsão lipídica pode alterar o clearance dos TG e as concentrações de ácidos graxos e da LPL. O aumento nos níveis de ácidos graxos depende da composição de TG e fosfolipídios da emulsão, e a velocidade em que a infusão é realizada. Na depuração das ELI administradas lentamente, a maioria dos ácidos graxos liberados durante a hidrólise dos TG na região endotelial é captada diretamente pelos tecidos. Desta forma, o aumento plasmático de ácidos graxos é moderado. Por outro lado, a administração rápida de TG exógenos pode resultar em produção local de ácidos graxos e saturação da capacidade de assimilação tecidual (CARPENTIER, 1989).

Considera-se que a taxa de eliminação de ácidos graxos é similar entre as emulsões lipídicas e os quilomícrons endógenos (HULTIN et al., 1995). Porém, é importante ressaltar que a composição da fase lipídica, o tamanho das gotículas, o emulsificador e a composição da superfície da lipoproteína podem afetar a farmacocinética da emulsão. Acredita-se, por exemplo, que a lipólise intravascular mediada pela LPL apresenta papel limitado na depuração de emulsões com óleo de peixe (HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010).

Sabe-se que emulsões compostas por MCT apresentam eliminação plasmática mais rápida (maior *clearance* plasmático) do que as com LCT, uma vez que a LPL hidrolisa de forma mais rápida e completa os MCT (HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010;

JOHNSON et al., 1990; WAITZBERG; TORRINHAS; JACINTHO, 2006). O metabolismo de MCT é pelo menos parcialmente independente do transporte de carnitina para a mitocôndria, e os ácidos graxos de cadeia média são preferencialmente oxidados ao invés de armazenados como gordura, o que justifica a metabolização mais rápida e completa dos MCT (JOHNSON et al., 1990; WAITZBERG; TORRINHAS; JACINTHO, 2006). Após 24 horas há baixa incorporação dos MCT ao tecido adiposo, com baixa presença em todos os tecidos (JOHNSON et al., 1990). JOHNSON et al. (1990) relataram que em 24 horas 80 a 90% dos MCT são convertidos a dióxido de carbono, enquanto no mesmo período somente 45% dos LCT passam por esse processo.

VILARÓ e LLOBERA (1988) relataram rápida eliminação dos TG em ratos medicados com 1,8 mL/kg de ELI, que voltaram a apresentar valores basais após 60 minutos. Também em ratos, os TG de uma emulsão lipídica apresentaram meia-vida de 6,4 minutos (maior do que a dos quilomícrons, de 4,0 minutos). Vinte minutos após a administração de emulsão lipídica, 80% do núcleo (gotículas) da emulsão havia sido removido da circulação sanguínea, porém somente 18% (ratos alimentados) e 31% (ratos em jejum) dos ácidos graxos havia sido eliminado (HULTIN et al., 1995).

Coelhos que receberam 1,0 mL de emulsão lipídica a 10% (óleo de soja emulsificada com lecitina) pela via IV apresentaram meia vida de clearance sanguíneo igual a cinco minutos (ILLUM et al., 1989).

A condição do paciente também influencia o metabolismo e a eliminação das emulsões. A depuração lipídica pode estar reduzida em pacientes críticos, obesos, diabéticos, com resistência à insulina, sepse, injúria renal aguda, hiperlipidemia ou com alterações hepáticas. Pode ser necessário reduzir a quantidade de ELI administrada, ou até mesmo cessá-la. Desta forma, é importante acompanhar a concentração plasmática de lipídios nesses pacientes (CROOK, 2000). É possível concluir que a coleta de sangue prévia ao início da infusão pode ter relevância clínica ao permitir melhor avaliação do estado do paciente e da variação na concentração sanguínea de lipídios.

1.1.5 A EMULSÃO LIPÍDICA INTRAVENOSA NA TOXICOLOGIA

Em 1962, foi observada redução no tempo de anestesia por tiopental em ratos medicados com emulsões gordurosas intravenosas (emulsão oleosa a base de semente de algodão ou de

milho). Sugeriu-se que o menor tempo de anestesia ocorreu devido à afinidade do barbitúrico à gordura, e criou-se a hipótese de que as emulsões poderiam ser utilizadas como analépticos contra a sensibilidade ao tiopental (RUSSELL; WESTFALL, 1962).

Em 1998 foi comprovado pela primeira vez que o pré-tratamento com ELI aumentava a dose de bupivacaína necessária para causar assístole em ratos, e que a utilização da emulsão lipídica após a intoxicação aumentava a sobrevivência a curto prazo desses animais. Neste mesmo experimento, também foi observada partição da bupivacaína para a fração lipídica da mistura plasma-emulsão (maiores concentrações do anestésico local na fração lipídica). Considerou-se que esta partição poderia explicar parte do mecanismo de ação da ELI em intoxicações (WEINBERG et al., 1998). Este experimento foi aplicado a cães, e conclusões similares foram obtidas. Todos os animais (n=6) intoxicados, com colapso vascular pela bupivacaína, e tratados com ELI (*bolus* de 4,0 mL/kg seguido de infusão contínua de 0,50 mL/kg/min durante 10 minutos) sobreviveram com melhora da condição hemodinâmica, ao contrário do grupo controle tratado com salina, em que todos os animais foram a óbito (WEINBERG et al., 2003).

O primeiro relato de aplicação clínica da ELI como antídoto na medicina humana foi publicado em 2006. Um homem apresentou alteração da consciência e ocorrência de crises epilépticas seguidas de assístole imediatamente após a realização de bloqueio anestésico com o AL bupivacaína para procedimento cirúrgico ortopédico por artroscopia. Os procedimentos de reanimação cardio-pulmonar tradicionalmente preconizados foram realizados durante 20 minutos, sem resposta adequada. Em seguida, foi administrada ELI a 20% (aproximadamente 1,22 mL/kg) concomitantemente às manobras de reanimação. Em poucos segundos foi observado retorno de ritmo cardíaco sinusal (90 batimentos por minuto) e detecção de pulso, e foi instituída infusão adicional de 0,5 mL/kg/min de ELI durante 2 horas. Após duas horas e meia, o paciente já se encontrava consciente e responsivo, e posteriormente não foram detectadas quaisquer sequelas (ROSENBLATT et al., 2006).

Desde então, a utilização desta emulsão no tratamento de toxicidade por AL e outras intoxicações graves por diferentes fármacos cardiotoxicos e/ou neurotóxicos vem expandindo significativamente (GWALTNEY-BRANT; MEADOWS, 2018; LEVINE et al., 2016).

A primeira utilização documentada na clínica toxicológica veterinária foi em um cão de 16 semanas de idade que apresentou crises epilépticas, paralisia, deficiência respiratória e coma devido à intoxicação por moxidectina. Após administração de *bolus* de 2,0 mL/kg de ELI e

infusão na taxa de 0,06 mL/kg/min durante quatro horas, o animal apresentou resposta discreta. A terapia foi repetida após 15 horas (0,5 mL/kg/min durante 30 minutos), e em 30 minutos o filhote apresentou melhora dramática. Seis horas após o término da segunda infusão o estado neurológico do animal era normal, sem maiores complicações. Os autores especularam que a ELI resultou em reversão dos sinais de toxicidade causados pela sobredose de moxidectina, e aparente redução no tempo de recuperação (CRANDELL; WEINBERG, 2009).

1.1.6 MECANISMOS DE AÇÃO

O mecanismo de ação da ELI em intoxicações ainda não é completamente compreendido, e o seu melhor entendimento resultará em melhor aplicação e otimização da terapia (LESKIW; WEINBERG, 2009).

Inicialmente, a principal teoria aceita foi a conhecida como *lipid sink*, em que a ELI seria responsável por um efeito de partição e sequestro do agente tóxico. No sangue, as gotículas de gordura criam um compartimento plasmático separado da fração aquosa, no qual substâncias lipofílicas podem se dissolver. Os fármacos de alta lipossolubilidade seriam, então, extraídos para a partição lipídica, com conseqüente redução na quantidade disponível ao tecido e aos seus receptores alvo (CAO et al., 2015; FERNANDEZ et al., 2011; FETTIPLACE et al., 2015; HARVEY; CAVE; ONG, 2014; HARVEY; CAVE, 2008; KAZEMI et al., 2011; PEACOCK, 2014; SHI et al., 2013; WEINBERG et al., 2006, 2003, 1998). Uma substância é considerada lipofílica quando o coeficiente de partição (logP) é maior que 1, o qual é obtido pela diferença da solubilidade da substância entre dois solventes, como água deionizada e octanol (EDWARDS; SHIAB; SCOTT, 2014). Acredita-se que quanto maior o logP do fármaco, maior partição ocorrerá (PAPADOPOULOU et al., 2012). É possível que o efeito de partição ocorra preferencialmente frente a maiores concentrações teciduais e nas fases iniciais da intoxicação, indicando a importância da administração precoce da ELI, quando as concentrações teciduais estão altas (DUREAU et al., 2016; FETTIPLACE et al., 2015; PAPADOPOULOU et al., 2012). Além da lipofilicidade, efeitos como o estado iônico do agente e outras características físico-químicas podem potencialmente afetar a ligação dos fármacos à ELI (FETTIPLACE; WEINBERG, 2018).

Estudos prévios já comprovaram o efeito de partição. WEINBERG et al. (1998) sugeriram que a ELI tem grande capacidade de reter o AL bupivacaína devido a este efeito. A administração IV de lipídios a porcos medicados com amiodarona resultou em concentrações

mais altas do fármaco na fração lipídica plasmática e consequente menor queda na pressão arterial média destes animais. Estes resultados corroboraram a teoria inicial de sequestro dos fármacos lipofílicos, o que teria evitado a ação hipotensiva da amiodarona (NIIYA et al., 2010). Resultados encontrados por PAPADOPOULOU et al. (2012) também apoiaram a teoria de que a emulsão lipídica reduz a concentração de fármacos lipossolúveis livres no plasma.

Entretanto, foi observado que este sequestro, com ligação do fármaco tóxico a um reservatório estático, não é suficiente para explicar completamente os benefícios obtidos com a utilização da ELI, o que sugere a participação de outros mecanismos (FETTIPLACE et al., 2014; FETTIPLACE; WEINBERG, 2018; HARVEY; CAVE; ONG, 2014), e pode justificar ação inclusive quando fármacos menos lipofílicos estão envolvidos (FETTIPLACE et al., 2014).

A teoria de modulação farmacocinética, também amplamente aceita, é uma extensão do efeito de partição, e sugere que a ELI resulta em aceleração da redistribuição (CAVE; HARVEY, 2014; FETTIPLACE et al., 2015; FETTIPLACE; WEINBERG, 2018; KAZEMI et al., 2011; LITONIUS et al., 2012; SHI et al., 2013), e favorece a saída do fármaco de órgãos susceptíveis, em direção a órgãos de perfusão mais lenta, além de eliminação acelerada (CAVE; HARVEY, 2014; FETTIPLACE et al., 2015; FETTIPLACE; WEINBERG, 2018; KAZEMI et al., 2011; SHI et al., 2013).

A modificação na farmacocinética da bupivacaína após a administração de ELI, com redução da meia vida no plasma total (LITONIUS et al., 2012), aumento da meia-vida de redistribuição (FETTIPLACE et al., 2015; SHI et al., 2013), redução da constante de movimento do compartimento central para o periférico, com favorecimento da partição do fármaco para o sangue ao invés de para tecidos como encéfalo, coração, rins e pulmões, maior direcionamento para o fígado, e redução da meia-vida de eliminação (FETTIPLACE et al., 2015; SHI et al., 2013), foram relatados em condições experimentais. Alteração na farmacocinética, com redução significativa da concentração sanguínea máxima dos anestésicos locais levobupivacaína e ropivacaína, foi observada em voluntários humanos (DUREAU et al., 2016).

Dentre os mecanismos não associados à remoção do fármaco, podem ser citados os efeitos diretos sobre o coração e a vasculatura, além da ativação de quinases pro-sobrevivência, que reduzem os danos isquêmicos e aumentam a perfusão tecidual. Melhor contratilidade miocárdica, débito cardíaco, fluxo e pressão sanguínea pela ação da ELI na vasculatura e no

coração, e ativação de vias cardioprotetoras e benefício pós-condicional foram relatados (FETTIPLACE; WEINBERG, 2018). Contribuição do volume e de um efeito cardiotônico nos mecanismos relacionados com a utilização benéfica da ELI em intoxicações também foram sugeridos (FETTIPLACE et al., 2014, 2015; HARVEY; CAVE; ONG, 2014).

Desta forma, atualmente acredita-se que a ELI atua nas intoxicações de forma multimodal, removendo o fármaco pelo compartimento lipídico, produzindo efeito inotrópico e acelerando o metabolismo microsomal que, juntos, aceleram a saída do agente dos órgãos sujeitos à toxicidade e sua excreção (FETTIPLACE et al., 2015). O compartimento lipídico intravascular criado pela administração da ELI seria o responsável por um efeito de varredura, remoção e redistribuição. As substâncias lipossolúveis sofreriam partição entrando e saindo do amplo compartimento lipídico, sendo transportadas e aumentando a redistribuição e movimentação dos órgãos susceptíveis à toxicidade, com alto fluxo sanguíneo como o coração e encéfalo, para órgãos de armazenamento e de detoxificação. Desta forma, sua ação principal seria dinâmica, de transporte e modulação da distribuição, ao invés de simplesmente sequestrar os fármacos lipossolúveis (FETTIPLACE; WEINBERG, 2018; KAZEMI et al., 2011).

Outros potenciais mecanismos de ação propostos inicialmente, como a ação direta em canais iônicos, alteração na entrada de cálcio nos cardiomiócitos, e efeito de massa com sobreposição à bloqueio do metabolismo mitocondrial, foram descartados devido à falta de evidência clínica (FETTIPLACE; WEINBERG, 2018).

1.1.7 INDICAÇÕES

A indicação da utilização da ELI para reversão de intoxicações agudas causadas por vários fármacos baseia-se principalmente em relatos de caso e experimentos animais (HAYES et al., 2016).

Os relatos da utilização da ELI na clínica toxicológica em humanos são muito heterogêneos, além de haver grande variedade de medicamentos administrados concomitantemente, dificultando a afirmação de efeito benéfico da utilização da ELI por si só. Em busca de indicações baseadas em evidências, uma comissão foi formada por membros especialistas na área para levantamento e avaliação dos estudos e relatos publicados sobre o tema. Ao final deste levantamento, foi sugerida a utilização da ELI a 20%, após a implantação de medidas de suporte, em situações de risco à vida devido a intoxicações por bupivacaína.

Faltam evidências que apoiem a sua utilização no envolvimento de outros AL, porém a sua administração é considerada de baixo risco. Desta forma, há consenso de que a infusão pode ser indicada nos casos em que os pacientes intoxicados por outros AL não respondem ao tratamento convencional, ou como último recurso (GOSSELIN et al., 2016).

Segundo GREGORIO et al. (2009), os lipídios atuam como um antídoto de rápida ação em paradas cardíacas causadas pela bupivacaína. Esta terapia se mostrou, inclusive, superior a alguns fármacos tradicionalmente utilizados. Um estudo randomizado prospectivo realizado em ratos com assístole devido à sobredose de bupivacaína, evidenciou melhor resposta hemodinâmica e metabólica nos animais tratados com ELI em comparação com os medicados com vasopressores (vasopressina sozinha ou em combinação com epinefrina). Ao contrário dos outros grupos, todos os animais tratados com ELI apresentaram circulação espontânea após 10 minutos. Nenhum animal do grupo que recebeu a emulsão apresentou edema pulmonar visível, enquanto todos os outros desenvolveram rapidamente edema pulmonar (GREGORIO et al., 2009).

É possível que a ELI seja uma opção efetiva para o tratamento de toxicidade cardíaca causada por substâncias lipofílicas em geral. Acredita-se que, em intoxicações por agentes com logP acima de 2, pode haver benefício da utilização da ELI (CAO et al., 2015). Desta forma, o uso da ELI para reversão de intoxicações tem sido estendido para o tratamento de intoxicações por outros compostos lipídicos além dos AL (BATES et al., 2013; LESKI; WEINBERG, 2009).

Um levantamento de publicações referentes à utilização da ELI em intoxicações sugere que as recomendações clínicas atuais são muitas vezes baseadas em evidências de baixa qualidade. Estes autores consideraram que estudos que demonstram a mensuração do fármaco, para a determinação da carga tóxica, são essenciais para que indicações possam ser feitas (GOSSELIN et al., 2016).

Apesar de vários relatos sugerirem efeito benéfico da utilização da ELI em intoxicações por diversos fármacos, há evidência experimental forte somente para alguns agentes (FETTIPLACE et al., 2015). A avaliação não randomizada, ausência de grupo controle, falhas de metodologia, variabilidade na dose, taxa de administração e na formulação da ELI, exposição concomitante a mais de um agente tóxico, heterogeneidade nos resultados obtidos, ausência de detalhes sobre o momento de aplicação, tempo entre a administração e a alteração clínica, tendência de publicação dos resultados positivos ao invés dos negativos, e utilização

concomitante de outros tratamentos e fármacos, dificultam a avaliação do efeito gerado somente pela ELI e a comparação direta dos dados obtidos (LEVINE et al., 2016).

Baseados na literatura atual, GOSSELIN et al. (2016) consideraram que a decisão de utilização da ELI em humanos deve ficar a cargo dos clínicos, avaliando os prós e contras, em intoxicações com risco à vida causadas pelos agentes baclofeno, ivermectina e outros inseticidas, malation e outros pesticidas, olanzapina e outros anti-psicóticos, e inibidores seletivos da reutilização de serotonina. Porém, são contra a utilização em situações sem risco à vida.

Na medicina veterinária, BATES et al. (2013) sugeriram que essa terapia deve ser considerada em intoxicações graves causadas por lactonas macrolíticas (como ivermectina e moxidectina), AL, permetrina e baclofeno. Em intoxicações pela ivermectina, é possível que o animal tenha completa recuperação sem a administração da ELI, porém há relatos que sugeriram que a recuperação é mais rápida quando a infusão é realizada (BATES et al., 2013).

Apesar de não poder ser estabelecida como a terapia padrão em intoxicações causadas por fármacos lipossolúveis por ser uma terapia nova que ainda não apresenta avaliação prospectiva completa, de modo geral a sua indicação pode ser considerada em casos graves causados por agentes lipofílicos, com instabilidade hemodinâmica e risco à vida, sem resposta adequada à terapia convencional (BECKER; YOUNG, 2017; CAO et al., 2015; HOJER et al., 2016; LEVINE et al., 2014). BECKER E YOUNG (2017) também citaram a indicação em casos de alterações neurológicas graves e após a ingestão de doses letais de substâncias lipossolúveis.

O tempo após a intoxicação no qual a ELI ainda é efetiva não foi determinado, potencialmente variando com o metabolismo do paciente, meia-vida do agente tóxico, condição médica concomitante, e outras medicações administradas concomitantemente (BECKER; YOUNG, 2017).

1.1.8 PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO

Não há, ainda, definição clara de um protocolo padrão de utilização da ELI. As indicações são em grande parte empíricas, sem suficiente embasamento científico (CAO et al., 2015). Maiores estudos são necessários para a determinação da dose e tempo de infusão ideais (GOSSELIN et al., 2016). É possível, porém, que o protocolo tenha que ser ajustado de acordo com o agente específico envolvido (EDWARDS; SHIHAB; SCOTT, 2014). A dose utilizada

na toxicologia tende a ser superior ao limite máximo diário indicado para a alimentação parenteral (GOSSELIN et al., 2016).

A literatura cita várias doses de *bolus*, taxas e duração das infusões, porém o mais realizado e aceito atualmente é a administração inicial de ELI a 20% em *bolus* de 1,5 mL/kg, seguido de infusão na taxa de 0,25 mL/kg/min por 30 minutos a 60 minutos (BATES et al., 2013; BECKER; YOUNG, 2017; FERNANDEZ et al., 2011; GOSSELIN et al., 2016). É possível que em intoxicações por agentes pouco lipofílicos sejam necessárias doses maiores (EDWARDS; SHIHAB; SCOTT, 2014).

O limite superior aceitável de administração de ELI, diretamente relacionado com o manejo clínico, é desconhecido (HILLER et al., 2010). As sugestões de dose e taxa máxima são baseadas em efeitos colaterais observados com NPT (HAYES et al., 2016). Apesar de não haver dados suficientes para a determinação de uma dose máxima segura, foi sugerido que a quantidade de emulsão lipídica administrada não seja superior a 10% do volume sanguíneo total do indivíduo. Esta medida é uma tentativa de se evitar a sobrecarga volumosa ou a ocorrência de hiper-trigliceridemia (GOSSELIN et al., 2016). Na medicina humana, em geral, os relatos de sucesso terapêutico apresentam como dose máxima 10 mL/kg (CAO et al., 2015).

HILLER et al. (2010) estimaram em ratos adultos machos a dose letal mediana (DL₅₀) máxima em 67,72 mL/kg ($\pm 10,7$ mL/kg). Esta dose é pelo menos três vezes superior à dose comumente recomendada em publicações da utilização da ELI na reversão de intoxicações. Apesar de mais estudos serem necessários para determinar a dose tóxica da ELI, estes resultados sugerem que na condição de antídoto ela apresenta ampla margem de segurança (HILLER et al., 2010).

Até que o perfil de efeitos adversos desta infusão seja determinado, sugere-se a utilização da menor dose possível. Ao invés de se basear em parâmetros hemodinâmicos arbitrários, recomenda-se metas fisiológicas significativas. A infusão deve ser cessada quando há melhora clínica adequada ou quando a dose máxima é atingida, apesar desta ainda ser considerada especulativa e maiores estudos serem necessários (GOSSELIN et al., 2016).

Em geral, as ELI são isotônicas e podem ser administradas em acessos periféricos (CROOK, 2000; DRISCOLL, 2006). O uso de filtros no circuito de infusão para administração de alimentação parenteral foi sugerido, porém essa medida ainda não foi padronizada (BECKER; YOUNG, 2017).

Estudos comparativos entre as diferentes formulações da ELI em intoxicações por fármacos que não são AL são escassos e insuficientes para que uma indicação baseada em evidências possa ser realizada. A maioria dos relatos cita a concentração de 20% sem ao menos determinar a marca da ELI utilizada (GOSSELIN et al., 2016). Não se sabe se formulações diferentes das emulsões lipídicas resultam em diferentes efeitos adversos (HAYES et al., 2016).

O sequestro para o compartimento lipídico pode reduzir a concentração de droga livre, porém foi especulado que o aumento da concentração plasmática total do fármaco pode ser suficiente para agir como um novo alvo de eliminação extracorpórea (HARVEY; CAVE; ONG, 2014). Desta forma, os animais tratados com a ELI devem ser monitorados de perto para avaliação da possibilidade de recorrência da sintomatologia após o término da infusão (BATES et al., 2013).

1.1.9 EFEITOS COLATERAIS

Há 50 anos a ELI apresenta registros extraordinários de segurança. Durante seu uso convencional, efeitos adversos como pancreatite, insuficiência hepática, dispneia e anafilaxia são raros e geralmente associados à administração rápida ou sobredose (HOJER et al., 2016).

Várias complicações já foram relatadas desde o início da utilização da ELI, especialmente em humanos, como lipemia, pancreatite secundária à lipemia, lesão hepática, colestase, injúria renal aguda, potencial interferência na ação de outros medicamentos lipossolúveis, parada cardíaca, incompatibilidade ventilação-perfusão, lesão pulmonar aguda, desenvolvimento de síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), hipoxemia, reações de hipersensibilidade ou alergia, síndrome da sobrecarga gordurosa, embolismo gorduroso, tromboembolismo, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, interferência em exames laboratoriais, obstrução do circuito de circulação extra-corpórea, priapismo, disfunção das células imunes, sepse secundária ao crescimento bacteriano no frasco da emulsão ou no circuito de infusão, e flebite (BECKER; YOUNG, 2017; COLOMB et al., 2015; HAYES et al., 2016; WEIDMANN et al., 1997). Entretanto, a ocorrência de efeitos colaterais graves devido ao uso da ELI é rara (BECKER; YOUNG, 2017).

Os efeitos colaterais podem ocorrer minutos a horas após a infusão, e nos casos de exposição a longo prazo podem ocorrer após semanas a anos. Com exceção das reações de hipersensibilidade e alergia, as manifestações imediatas ou de curto prazo geralmente são relacionadas com sobredose ou velocidade de administração elevada (HAYES et al., 2016).

Os relatos de complicações, porém, apresentaram pacientes e condições de saúde muito heterogêneos, além de falha na descrição dos protocolos utilizados, o que dificulta que seus resultados sejam generalizados e correlacionados diretamente com a utilização da ELI. Deste modo, pode ser difícil determinar se a alteração observada foi decorrente da infusão ou devido à condição prévia dos pacientes (HAYES et al., 2016).

A sobrecarga gordurosa (geralmente acompanhada de deposição de gordura no fígado, cérebro ou rins), hipertrigliceridemia, lipemia, hiperamilasemia, pancreatite e colestase estão entre os efeitos colaterais mais comuns após a administração da ELI. Na maioria dos casos, as alterações laboratoriais são transitórias, sem afetar a recuperação do paciente (HAYES et al., 2016).

A administração rápida, ou em dose excessivamente alta, aumenta o risco de ocorrência de êmbolo gorduroso (BATES et al., 2013). Esta complicação é mais associada à NPT, e relatos de embolismo gorduroso após a administração de emulsão em intoxicações não foram encontrados (HAYES et al., 2016).

Atualmente os efeitos adversos causados pela NPT são raros quando as suas diretrizes são seguidas, com dose máxima geral de lipídios de 2 g/kg/dia (10 mL/kg/dia de ELI a 20%) e velocidade preferencialmente de até 0,11 g/kg/h (0,55 mL/kg/h de ELI a 20%), não excedendo 0,125 mg/kg/h (0,625 mL/kg/h de ELI a 20%) (HAYES et al., 2016).

Enquanto os riscos da administração prolongada de ELI na alimentação parenteral já foram bem estabelecidos, o risco à imunidade ou à outras funções fisiológicas causado pela sua infusão por período inferior a 24 horas, como é realizado na toxicologia, ainda não foi estabelecido (GOSSELIN et al., 2016; CAO et al., 2015). Poucas complicações são relatadas após a utilização da ELI para reversão de intoxicações, porém, uma vez que frequentemente a dose e a taxa utilizadas superam a indicada na NPT, é possível que a escassez de relatos seja devido à subnotificação ou falha na detecção dos efeitos adversos. Desta forma, a real incidência de efeitos adversos pela utilização da ELI como antídoto ainda é incerta, e muitas vezes os possíveis efeitos colaterais são extrapolados das reações causadas pela NPT com ELI (HAYES et al., 2016; LESKIW; WEINBERG, 2009).

Em um estudo retrospectivo humano, foram avaliadas as complicações associadas com a utilização da ELI no tratamento de intoxicações por drogas lipofílicas. Dos nove pacientes que entraram nesse estudo, seis apresentaram efeito colateral, sendo que dois tiveram pancreatite, quatro interferência na interpretação dos resultados laboratoriais devido à lipemia, e três desenvolveram SARA de forma transitória (LEVINE et al., 2014). LESKIW e

WEINBERG (2009) citaram em humanos a ocorrência de aumento da enzima amilase, porém sem sinais clínicos de pancreatite.

O principal efeito adverso relatado é a hiperlipidemia (CAO et al., 2015). Após o tratamento de 10 animais (nove cães e um gato) com ELI, seis apresentaram hiperlipidemia transitória com resolução após oito horas a três dias. Outros efeitos adversos não foram observados e o tratamento foi considerado seguro (BECKER; YOUNG, 2017). BECKER e YOUNG (2017) afirmaram desconhecer complicações além da hiperlipidemia na medicina veterinária. Cabe ressaltar que não há relatos de sequelas causadas pela ELI em cenário de intoxicações (HAYES et al., 2016).

BATES et al. (2013) relataram, após a utilização da ELI em seis cães, reação somente em um animal devido ao extravasamento da infusão, gerando discreta dor e edema no membro afetado. O quadro foi completamente resolvido com tratamento conservativo. Não foi observada, porém, qualquer sequela.

UDELSMANN e MELO (2015) descreveram alterações hemodinâmicas como hipertensão arterial e pulmonar após a administração de altas doses de ELI 20% em suínos. Porém, essa espécie é considerada hipersensível a estas emulsões, e desta forma estes achados não podem ser extrapolados para outras espécies.

HILLER et al. (2010) avaliaram o efeito da administração de ELI a 20% em ratos adultos machos, nas doses de 20, 40, 60 ou 80 mL/kg em um período de 30 minutos. Imediatamente após a administração da emulsão lipídica foi observado aumento na concentração sérica de TG, com normalização após 48 horas. Neste período também foi observado aumento na atividade sérica de amilase, aspartato aminotransferase (AST), e na concentração sérica de fósforo e ureia em todas as doses utilizadas. Não houve alteração nos níveis de albumina, proteína total (PT), fosfatase alcalina (FA), creatinina e alanina aminotransferase (ALT). Durante avaliação histológica, não foram observadas alterações no miocárdio, encéfalo, pâncreas e rins, porém anormalidades ocorreram nos pulmões e no fígado. Espessamento focal do septo alveolar e alguns histiócitos espumosos intra-alveolares foram observados após a administração de 60 mL/kg, enquanto congestão vascular hemorrágica ocorreu com a administração de 80 mL/kg. Uma hora após a administração de 60 mL/kg, foram observados dois infartos pulmonares, enquanto após 4 e 24 horas havia somente discreta fibrose intersticial e mínima congestão capilar. Esteatose microvascular focal foi observada em menos de 1% dos hepatócitos com a administração de 20 mL/kg, em 10 a 20% dos hepatócitos com 40 mL/kg, e em 70 a 80% com 60 mL/kg. Após 24 horas, a esteatose foi observada somente em 10% dos hepatócitos dos

animais que receberam 60 mL/kg. A dose de 80 mL/kg resultou em necrose extensa, porém os autores ressaltaram que há a possibilidade destas alterações terem sido post-mortem. Alterações neurológicas não foram observadas, com a exceção de discreta letargia no grupo de 80 mL/kg, e a frequência cardíaca (FC) e o intervalo QRS não foram alterados pelas infusões realizadas. Três animais foram a óbito: um no grupo que recebeu 60 mL/kg, e dois no de 80 mL/kg. Todavia, os efeitos deletérios observados neste experimento ocorreram com a administração de doses muito superiores às atualmente indicadas, e os autores concluíram que a dose usualmente utilizada no tratamento de pacientes intoxicados é segura (HILLER et al., 2010).

Apesar dos efeitos colaterais serem raramente relatados, eles devem ser cuidadosamente levados em consideração pelos clínicos, especialmente em situações sem risco à vida (HAYES et al., 2016). A relação risco-benefício desta terapia deve ser avaliada em cada caso (LEVINE et al., 2014).

Uma vez que a ELI tem na sua composição soja e fosfolipídios provenientes da gema do ovo, a sua administração deve ser evitada em indivíduos com alergia a ovo (BATES et al., 2013) e soja (GHATAK; SAMANTA; BARONIA, 2014; WEIDMANN et al., 1997).

A ELI deve ser evitada em situações de hipóxia, pois possivelmente a oxigenação adequada é imprescindível para a resposta benéfica da terapia (LESKIW; WEINBERG, 2009). A sua utilização também é contraindicada em animais com alterações no metabolismo lipídico ou hepatopatias (BATES et al., 2013). HILLER et al. (2010) sugeriram que a utilização da ELI deve ser realizada com cautela em pacientes com alterações renais, pancreáticas, hepáticas ou pulmonares (HILLER et al., 2010).

Pacientes que receberam ELI devem ser monitorados para possíveis complicações posteriores (LEVINE et al., 2014) e recorrência dos sinais de intoxicação após o término da infusão, quando nova administração pode ser necessária (BATES et al., 2013). O clearance lipídico também deve ser monitorado. Pacientes com concentrações de TG muito altas devem ter a infusão reduzida ou cessada, uma vez que pancreatite aguda já foi associada à hipertrigliceridemia intensa. Os indivíduos que apresentam hiperlipidemia, sepse, sobrepeso, deficiência renal, diabetes mellitus ou resistência à insulina, que estão em estado crítico ou com alterações hepáticas, podem ter redução na capacidade de eliminação lipídica (CROOK, 2000).

É importante ressaltar que frente ao colapso cardiovascular nenhuma contraindicação é absoluta (CAO et al., 2015).

1.2 DIAZEPAM

Crises epilépticas são complicações frequentes em intoxicações, e em humanos o estado epiléptico pode ocorrer em até 10% dos casos. Esses episódios, quando prolongados, podem resultar em complicações graves como dano neuronal irreversível, hipóxia, hipotensão, hipertermia, acidose metabólica e rabdomiólise. Desta forma, tratamento rápido e adequado é imprescindível. Os benzodiazepínicos são os antiepilépticos mais comumente recomendados como primeira escolha para o controle das crises epilépticas causadas por tóxicos (CHEN; ALBERTSON; OLSON, 2015).

O DZ, o benzodiazepínico mais lipofílico e mais utilizado na medicina veterinária, apresenta potente efeito antiepiléptico e é considerado a primeira escolha para o manejo precoce do estado epiléptico. Além da sua ação antiepilética, ele também é amplamente utilizado no controle de várias desordens do sistema nervoso central (SNC) devido ao seu efeito ansiolítico, relaxante muscular, sedativo, e sua efetividade e relativa segurança (CALCATERRA; BARROW, 2014; FLAHERTY, 2009; GAUDREAULT et al., 1991; KAUR; KIM, 2008).

1.2.1 ABSORÇÃO E BIODISPONIBILIDADE

O DZ pode ser administrado pela via oral (VO), IV, intramuscular (IM), intranasal (IN) ou retal (KAUR; KIM, 2008; MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). Ele apresenta, em geral, rápida absorção devido à sua alta lipofilicidade (KAUR; KIM, 2008).

O DZ apresenta alta disponibilidade e, desta forma, é rapidamente e quase completamente absorvido após a administração oral. O tempo até o pico da concentração plasmática varia com a dose administrada (CALCATERRA; BARROW, 2014; GAUDREAULT et al., 1991), porém segundo MANDELLI, TOGNONI e GARATTINI (1978) em humanos ocorre 30 a 90 minutos após a administração pela VO. Nela, a biodisponibilidade varia de 93 a 100% (CALCATERRA; BARROW, 2014). Variação individual das concentrações plasmáticas após administração oral ocorre e a absorção também pode ser alterada com a idade do indivíduo, tendendo a ser mais rápida em pacientes jovens e mais lenta e baixa em geriátricos (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978).

A absorção após a administração IM é lenta e irregular, com pico de concentração plasmática menor em comparação à VO (pode atingir somente 60% dos níveis plasmáticos) (GAUDREAULT et al., 1991; MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). Quando

administrado pela via IV, apresenta 100% de biodisponibilidade e seu efeito farmacológico máximo é atingido rapidamente, em aproximadamente 10 minutos (KAUR; KIM, 2008). É importante ressaltar que a administração rápida pela via IV pode resultar em parada respiratória (GAUDREAULT et al., 1991).

Segundo MANDELLI, TOGNONI e GARATTINI (1978), a administração retal tende a ser mais lenta e imprevisível, atingindo 50% dos níveis plasmáticos obtidos após administração oral. Por outro lado, outros autores afirmaram que a via retal permite níveis plasmáticos e efeito farmacológico semelhantes à administração oral ou IM, atingindo seus picos de concentração plasmática após 20 a 30 minutos (SZNITOWSKA et al., 2001), com biodisponibilidade de 90% (CALCATERRA; BARROW, 2014).

1.2.2 LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Após a absorção, o DZ e o desmetildiazepam (DMDZ), seu principal metabólito, apresentam intensa ligação às proteínas plasmáticas (96,8 – 98,6%) (GAUDREAULT et al., 1991; KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976; MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). Esta ligação independe da concentração plasmática total do fármaco (ARENDRT et al., 1983). Em ratos medicados com 1,2 mg/kg de DZ, a ligação desse fármaco às proteínas plasmáticas ocorreu de forma linear em um amplo espectro de concentrações sanguíneas (40 - 800 ng/mL). A razão entre a concentração sanguínea e a plasmática também ocorreu de forma linear (IGARI et al., 1983).

A ligação do DZ à proteína afeta a sua distribuição e seu clearance, sendo o último aumentado significativamente com uma maior fração livre disponível (KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976). A fração livre do fármaco não está relacionada com a quantidade total de DZ (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978).

Idosos podem apresentar menor concentração plasmática de albumina, resultando em maior taxa de DZ livre (GREENBLATT et al., 1983). Da mesma forma, pacientes com cirrose hepática apresentam aumento significativo da fração livre. A ocorrência de efeitos colaterais é superior em pacientes com hipoalbuminemia, possivelmente devido à maior difusão no SNC pelo aumento da fração livre (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). Pacientes com insuficiência renal podem ter redução de 6% na ligação do DZ às proteínas, porém as

consequências clínicas desse efeito ainda não foram bem determinadas, sem haver, inclusive, alteração na taxa de eliminação (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978).

1.2.3 EFEITO CLÍNICO E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA

O início do efeito clínico de um fármaco está relacionado com o seu tempo de absorção, enquanto a duração de tal efeito depende primariamente da distribuição do fármaco. O DZ é absorvido rapidamente e, desta forma, apresenta efeito de início rápido e intenso após dose única (GREENBLATT et al., 1983). A taxa e a extensão da distribuição para tecidos periféricos, juntamente com a taxa de eliminação após a distribuição, são as determinantes da duração do efeito clínico (GAUDREAULT et al., 1991). Não há uma correlação simples entre os níveis plasmáticos de DZ e DMDZ e os seus efeitos clínicos (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978).

Os níveis plasmáticos de DZ diferem entre as espécies (CHENERY et al., 1987). Por exemplo, a concentração plasmática de DZ encontrada em coelhos é muito mais baixa do que a obtida em humanos, devido a diferenças no seu perfil farmacocinético (SZNITOWSKA et al., 2001).

Em coelhos Nova Zelândia medicados com 2 mg/kg de DZ por via retal, foi observada sedação e relaxamento muscular após 5 a 10 minutos. O efeito clínico cessou após 30 minutos a 2 horas. Estes animais apresentaram concentração plasmática máxima de $48,86 \pm 24,05$ ng/mL, com tempo para concentração máxima igual a 20 minutos (SZNITOWSKA et al., 2001). Por outro lado, após a administração IV de 1 mg/kg de DZ, também em coelhos Nova Zelândia, a concentração plasmática máxima foi de $373,1 \pm 10,7$ ng/mL (KAUR; KIM, 2008). O DMDZ pôde ser detectado 15 a 30 minutos após a administração IV de 2 mg/kg de DZ em coelhos, atingindo concentração máxima de 200 - 300 ng/mL após 1 a 2 horas (KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976).

Com o tempo, a concentração de DZ reduz rapidamente, de forma bi-exponencial (IGARI et al., 1982; KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976). A rápida queda inicial nos níveis plasmáticos é decorrente da distribuição do fármaco do compartimento central para os tecidos periféricos. Este processo pode ser caracterizado pela meia vida de distribuição. Em seguida, a queda na concentração de DZ ocorre lentamente (KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976).

1.2.4 BIOTRANSFORMAÇÃO

O DZ é biotransformado no fígado por meio de reações oxidativas pelas enzimas citocromo P450. Estas reações podem ser divididas em duas fases. Na primeira, ocorrem etapas de oxidação (demetilação e hidroxilação) que resultam na formação de metabólitos ativos (Figura 1.2). Desta forma, a biotransformação é iniciada com a remoção de um grupo metil (N-demetilação) para produção do DMDZ (também conhecido como nordiazepam). Em seguida o processo oxidativo continua com hidroxilação, produzindo o oxazepam. A segunda fase se baseia em processos de conjugação de grupos hidroxil ou amino, formando metabólitos inativos. O oxazepam é conjugado com glucuronídeo para sua eliminação, formando o principal metabólito urinário (conjugado e excretado em velocidade próxima à que é produzida) (CALCATERRA; BARROW, 2014; GAUDREAU et al., 1991; GREENBLATT et al., 1983; JOMMI; MANITTO; SILANOS, 1964; MERCOLINI et al., 2009). O temazepam (hidroxidiazepam) também pode ser formado e demetilado a oxazepam ou submetido à glucuronidação (MERCOLINI et al., 2009).

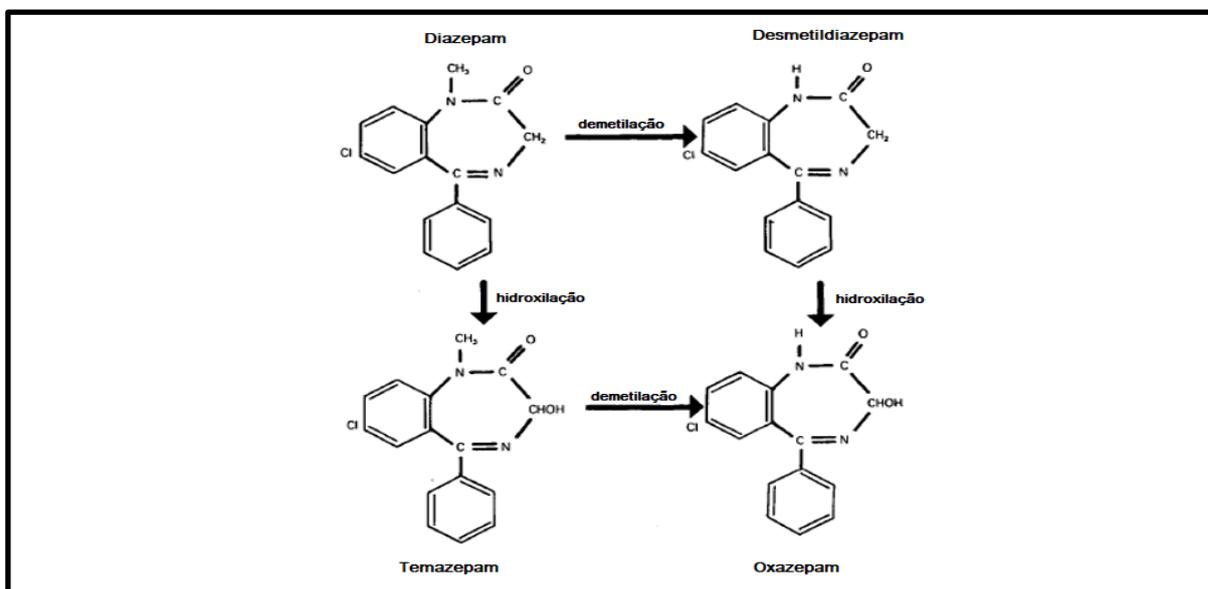


Figura 1.2 – Vias de biotransformação dos principais metabólitos do DZ (Adaptado de MANDELLI, TOGNONI e GARATTINI, 1978).

O perfil metabólico do DZ varia entre espécies, com diferentes taxas da formação e remoção dos metabólitos (CHENERY et al., 1987). As principais enzimas hepáticas responsáveis pela metabolização de fármacos são espécie-específicas (ACIKGÖZ et al., 2009). Em espécies de laboratório, ele é rapidamente metabolizado (CHENERY et al., 1987).

Assim como em ratos, reações de 4'-hidroxilação são importantes na metabolização do DZ em coelhos. Ao observar a metabolização do DZ em uma cultura de hepatócitos de coelhos, detectou-se que praticamente todo o fármaco metabolizado foi recuperado como DMDZ ou 4'-hidroxi-diazepam, sendo este último muito glucuronizado (CHENERY et al., 1987), em concordância com os achados *in vivo* de JOMMI, MANITTO e SILANOS (1964).

As vias oxidativas podem variar com a idade do indivíduo, presença de doenças hepáticas (como a cirrose), ou com a coadministração de outros agentes que podem aumentar ou reduzir (como a cimetidina ou a rifampicina) a capacidade oxidativa do fígado (GAUDREAULT et al., 1991; GREENBLATT et al., 1983).

Os produtos de demetilação são quantitativamente superiores aos de hidroxilação (JOMMI; MANITTO; SILANOS, 1964). Os principais compostos encontrados no sangue são o DZ e o DMDZ (GREENBLATT et al., 1983; MERCOLINI et al., 2009). IGARI et al. (1982) relataram quantidades significativas de oxazepam no plasma e em vários tecidos de ratos que receberam dose única de DZ. Observou-se, porém, concentração plasmática de DMDZ e oxazepam consideravelmente mais baixa do que a de DZ (IGARI et al., 1982).

O principal metabólito farmacologicamente ativo formado é o DMDZ, sendo rapidamente gerado (ARENDRT et al., 1983; JEPPSSON, 1976; KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976). Ele e o oxazepam mantém a atividade anti-epiléptica (MARCUCCI et al., 1968), e juntamente com o temazepam, por serem ativos, podem contribuir com o efeito farmacológico do DZ (MERCOLINI et al., 2009).

1.2.5 DISTRIBUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO TECIDUAL

O DZ é o benzodiazepínico mais lipossolúvel, e o V_d tem correlação positiva com a lipofilicidade do fármaco. Desta forma, ele é rapidamente e amplamente distribuído para outros tecidos corporais (alto V_d). É importante lembrar que esta distribuição pode resultar em queda da concentração sanguínea e, conseqüentemente, efeito de curta duração (ARENDRT et al., 1983; GAUDREAULT et al., 1991; GREENBLATT et al., 1983).

O DZ e o DMDZ apresentam V_d similar, porém o último apresenta maior meia-vida. Em humanos, o V_d é de 0,95 – 2,0 L/kg (GAUDREAULT et al., 1991; MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). Em estado estável, o V_d de coelhos (n=3) foi de $5,5 \pm 1,5$ L/kg, de cães (n=4) foi de $5,6 \pm 1,3$ L/kg e de ratos (n=3) foi de $4,5 \pm 0,6$ L/kg (KLOTZ;

ANTONIN; BIECK, 1976). Em outro estudo avaliando ratos, o V_d em um estado estável foi de $5,3 L \pm 0,5 L/kg$ (IGARI et al., 1982).

A razão entre a concentração de DZ tecidual e a plasmática arterial em ratos 8 horas após terem sido medicados com 1,2 mg/kg de DZ foi determinada. A maior razão foi encontrada no tecido adiposo (12,9), seguida do fígado (4,89). Dos órgãos avaliados, a menor razão encontrada foi no encéfalo (1,02) (Quadro 1.1) (IGARI et al., 1983).

Quadro 1.1 – Razão corrigida entre a concentração de DZ nos tecidos e no plasma arterial após administração IV única de 1,2 mg/kg de DZ em ratos.

Tecido	Razão entre concentração tecidual e sanguínea
Encéfalo	1,02
Pulmão	3,26
Coração	2,19
Fígado	4,89
Intestino delgado	1,85
Rim	2,30
Músculo	1,37
Pele	3,37
Tecido adiposo	12,9

Fonte: Adaptado de IGARI et al. (1983).

O acúmulo de DZ no tecido adiposo foi significativamente maior. Os altos níveis encontrados nesse tecido reforçam o conceito de que a distribuição está relacionada com a sua lipofilicidade (IGARI et al., 1982).

Em humanos, DZ foi observado no tecido adiposo em níveis mensuráveis (acima de 25 ng/g) 30 a 60 minutos após a administração de 10 mg do fármaco por via IV, porém DMDZ não foi observado. Entretanto, nos camundongos o DMDZ atinge níveis altos nesse tecido, e pode ser mensurado mesmo após a eliminação do DZ (MARCUCCI et al., 1968). Em ratos e camundongos medicados com DZ (5 mg/kg, IV) houve acúmulo progressivo do fármaco e dos seus metabólitos no tecido adiposo (branco e marrom) até 30 minutos após a administração, e

mesmo após 5 horas ele ainda podia ser detectado nesse tecido. Os metabólitos N-desmetilados ainda eram mensuráveis 10 horas após a exposição (MARCUCCI et al., 1968).

O acúmulo de um fármaco no tecido adiposo pode ter importância na sua atividade farmacológica (MARCUCCI et al., 1968). A rápida distribuição para o tecido adiposo justifica o seu efeito clínico curto e a falta de correlação entre a duração do efeito clínico e a sua meia-vida plasmática, como citado anteriormente no item 1.2.3 (GAUDREAULT et al., 1991).

O tecido alvo do DZ é o encéfalo (IGARI et al., 1983), onde ele se liga especificamente a receptores GABA_A (CALCATERRA; BARROW, 2014). A sua lipofilicidade permite a rápida penetração no SNC e rápido início de efeitos clínicos (início quase imediato após a administração IV) (GAUDREAULT et al., 1991). No encéfalo, o DZ e seus metabólitos se distribuem mais rapidamente na matéria cinzenta, e de forma prolongada na matéria branca. A matéria branca, altamente lipídica, atua como um compartimento profundo. As regiões com mais fluxo sanguíneo apresentam distribuição mais precoce (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978).

Observou-se o perfil da variação da concentração tecidual de DZ, DMDZ e oxazepam de acordo com o tempo em ratos, e o DZ foi distribuído rapidamente para fígado, rins, pulmões, encéfalo, coração e intestino delgado. Por outro lado, a distribuição ocorreu mais lentamente para o tecido adiposo e pele. Assim, a velocidade da distribuição do fármaco em ratos foi classificada como rápida (encéfalo, pulmão, fígado, rim, coração e intestino delgado), intermediária (músculo) ou lenta (tecido adiposo e pele) (IGARI et al., 1982).

A variação de acordo com o tempo da concentração de DZ e seus metabólitos no pulmão, rim e coração apresentou perfil similar à concentração plasmática, com redução gradual. Por outro lado, 30 minutos após a administração IV de DZ em ratos, foi observado um pico na sua concentração e de seus metabólitos no tecido adiposo e na pele. No fígado e no intestino delgado, apesar da concentração de DZ reduzir com o tempo, os níveis dos seus metabólitos se mantiveram tão altos quanto os do DZ, aumentando na fase final. Ao contrário do relatado em camundongos e cobaias, os níveis encefálicos dos metabólitos foram significativamente inferiores ao do DZ. O pico observado mais tardiamente no tecido adiposo e na pele pode ser justificado pelo grande volume tecidual, baixo fornecimento sanguíneo ou grande concentração de DZ (IGARI et al., 1982). Por outro lado o pico encefálico ocorre quase que imediatamente após a administração IV do DZ em ratos e camundongos, seguido de rápido declínio e presença somente de traços após 3 horas (MARCUCCI et al., 1968).

Em coelhos, a concentração encefálica de DZ foi muito superior à plasmática e do líquido cérebro-espinhal (LCE). O maior acúmulo no encéfalo pode ser explicado pela lipofilicidade do fármaco ($\log P = 2,8$) (KAUR; KIM, 2008). Assim como outros benzodiazepínicos, o DZ penetra rapidamente no LCE por difusão passiva. Em gatos, apresentou pico de concentração nesse fluido $3,7 \pm 1,3$ minutos após a sua administração (ARENDRT et al., 1983). Apenas 2 a 3% do DZ e 1 a 4% do DMDZ são encontrados no LCE, com boa correlação com a fração plasmática livre (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). A concentração encefálica máxima média ($1475,8 \pm 55,9$ ng/mL) ocorreu, em coelhos, 10 minutos após a administração IV de DZ, enquanto a do LCE ($66,2 \pm 9,8$ ng/mL) ocorreu após 5 minutos (KAUR; KIM, 2008).

Imediatamente após a administração IV de DZ (1,2 mg/kg) em ratos, seus metabólitos (DZMD, 3-hidroxi-diazepam, e oxazepam) foram identificados no plasma e nos tecidos. A concentração de 3-hidroxi-diazepam foi muito inferior à dos outros dois metabólitos. No fígado e no intestino delgado, ao contrário dos outros tecidos, os níveis teciduais dos metabólitos foram superiores aos de DZ (IGARI et al., 1982).

Em humanos idosos e doentes, a maior razão de absorção do DZ observada foi na glândula adrenal, fígado, coração e rim, com menores valores em pulmão, gordura e encéfalo. A concentração encontrada de DMDZ foi similar à de DZ, exceto por níveis significativamente mais baixos no tecido adiposo (FRIEDMAN et al., 1985).

Em um humano adulto, os maiores estoques de DZ seriam encontrados na musculatura (42%), gordura (35%), e fígado (12%). Menores quantidades seriam observadas no encéfalo (4,3%), pulmão (3,3%), rim (2%), coração (1,7%), e glândula adrenal (0,24%). Não foi observada diferença na absorção tecidual entre homens e mulheres. Aproximadamente um terço do estoque corporal de DZ em humanos está presente no tecido adiposo, porém ele aparenta ter menor afinidade pelo DMDZ (FRIEDMAN et al., 1985).

É importante ressaltar que o DZ atravessa a placenta, sendo de forma mais intensa ao final da gestação ou durante o parto. Este pode atingir, além da placenta, o encéfalo e o fígado fetal. A distribuição do compartimento materno para o fetal ocorre de forma rápida. Juntamente com o DMDZ, pode também ser transmitido pelo leite a neonatos (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978).

1.2.6 ELIMINAÇÃO

O DZ apresenta longa meia-vida de eliminação (GREENBLATT et al., 1983). Após a administração, ele sai da circulação sanguínea de forma bifásica. Inicialmente, há rápida queda na concentração plasmática devido à ampla distribuição do fármaco. Por outro lado, a redução devido à eliminação ocorre de forma lenta (GREENBLATT et al., 1983; MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). A eliminação do fármaco de todos os compartimentos ocorre em paralelo com a obtenção de equilíbrio de distribuição entre esses (ARENDDT et al., 1983).

O fármaco na forma livre é o que está verdadeiramente disponível para distribuição (ARENDDT et al., 1983). Desta forma, apesar de apresentar grande ligação à albumina, somente a fração não ligada fica disponível para a biotransformação, e posterior eliminação. Considera-se que estes fármacos são eliminados de forma restrita, limitado à capacidade de ligação à proteína (GREENBLATT et al., 1983; MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). A meia-vida e o clearance plasmático do DZ sofrem alterações entre as espécies (IGARI et al., 1983). Diferenças individuais na ligação plasmática podem alterar o V_d , a meia vida e o clearance do fármaco. O DZ livre determina a taxa de clearance hepático: quanto maior a fração livre, maior a taxa de clearance (KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976). Em pacientes com hipoalbuminemia, há maior fração do fármaco livre, com maior V_d e aumento do clearance plasmático. Alterações hepáticas podem resultar em metabolização retardada do DZ e clearance reduzido (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978).

A eliminação do DZ é rápida nos hepatócitos de cobaia, cão e rato, mas lenta em humanos (CHENERY et al., 1987). O temazepam e oxazepam são eliminados em taxa muito próxima à sua produção. Por outro lado, o DMDZ apresenta maior meia-vida (CALCATERRA; BARROW, 2014).

Cobaias (n=2) apresentaram meia-vida da eliminação de 2,4 horas, e clearance de 18,9 mL/min/kg (KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976). Em humanos, a meia-vida da eliminação é de 24 a 48 horas (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978), com clearance de 0,4 - 0,5 mL/min/kg (GAUDREAUULT et al., 1991). Achados similares foram encontrados por KLOTZ, ANTONIN e BIECK (1976), com meia-vida de eliminação de 32,9 horas, e clearance de 0,35mL/min/kg.

Em coelhos, diferentemente de humanos, o clearance sanguíneo é dependente do fluxo sanguíneo hepático. A meia-vida da eliminação em coelhos (n=3) foi de 2,7 horas, enquanto o clearance plasmático foi de 30,5 mL/min/kg (KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976). Coelhos

que receberam 2,5 mg de DZ por via IV apresentaram meia-vida plasmática do DZ de 107 ± 7 minutos, e do DMDZ de 409 ± 109 minutos (JEPPSSON, 1976). Em hepatócitos de coelhos, foi observado clearance de DZ de 0,45 mL/h/mg de proteína, 0,15 de DMDZ, 0,44 de temazepam e 0,14 de oxazepam (CHENERY et al., 1987).

Os ratos apresentam rápida eliminação e alto clearance comparado com outras espécies, excedendo inclusive o seu fluxo sanguíneo hepático (IGARI et al., 1983), o que sugere alta capacidade de metabolização do DZ por esse órgão (KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976). KLOTZ, ANTONIN e BIECK (1976) relataram meia-vida de eliminação de 1,1 horas e clearance de 81,6 mL/min/kg em ratos (n=3).

Gatos medicados com 2 mg/kg de DZ apresentaram meia-vida de eliminação de $5,24 \pm 0,35$ horas, e clearance de 6,6 mL/min/kg (clearance de DZ livre de 38,3 mL/min/kg) (ARENDRT et al., 1983).

O DMDZ apresenta meia-vida de eliminação superior à do DZ, possivelmente devido à taxa mais baixa de hidroxilação a oxazepam (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). O seu clearance apresenta a maior variação entre espécies, sendo maior nas espécies com significativa hidroxilação no ponto 4' desse metabólito (CHENERY et al., 1987).

O DZ não é excretado em quantidades significativas pela bile (MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978). Ele é praticamente completamente eliminado na forma de seus metabólitos pela urina, como glucuronídeos ou sulfatos, apesar de pequenas quantidades de DZ inalterado (forma livre) serem detectadas (CALCATERRA; BARROW, 2014; MANDELLI; TOGNONI; GARATTINI, 1978).

Ao avaliar a urina de coelhos medicados com DZ, foi observado que este fármaco não foi excretado pela urina em quantidades mensuráveis em sua forma original. Todos os produtos metabólicos excretados derivavam de precursores conjugados (JOMMI; MANITTO; SILANOS, 1964).

CAPÍTULO 2: EFEITOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA EMULSÃO LIPÍDICA INTRAVENOSA, E DA SUA ASSOCIAÇÃO AO DIAZEPAM, EM COELHOS HÍGIDOS

2.1 INTRODUÇÃO

Relatos sugeriram que o uso da ELI pode ser benéfico no tratamento de intoxicações por agentes lipofílicos como a ivermectina, moxidectina, permetrina e baclofeno. Todavia, animais intoxicados por estes fármacos podem apresentar crises epiléticas, disforia, agitação, tremores e rigidez muscular, e serem tratados com agentes lipossolúveis como o DZ, midazolam, propofol e barbitúricos, juntamente à ELI (BATES et al., 2013; CRANDELL; WEINBERG, 2009; DEGROOT, 2016; EDWARDS; SHIHAB; SCOTT, 2014; KHORZAD et al., 2012; SNOWDEN et al., 2006; VARGA, 2013a).

Os principais mecanismos de ação da ELI propostos atualmente sugerem a possibilidade de interação desta emulsão com diferentes agentes lipossolúveis (BATES et al., 2013; CAVE; HARVEY, 2014). É extremamente importante saber se estas infusões interferem na ação de fármacos utilizados concomitantemente em um estado emergencial, porém estas informações ainda não foram claramente obtidas (GOSELIN et al., 2016; LESKIW; WEINBERG, 2009). A possibilidade de interferência em terapias tradicionais pode impedir a indicação da sua utilização.

Outra informação essencial para a adequada indicação à utilização da ELI em intoxicações é a determinação da segurança deste procedimento. Enquanto os riscos da administração prolongada de ELI na alimentação parenteral já foram bem estabelecidos, o risco à imunidade ou às funções orgânicas causado pela infusão de ELI por período inferior a 24 horas, como é realizado na toxicologia, ainda não foi estabelecido (GOSELIN et al., 2016; CAO et al., 2015). Poucas complicações são relatadas após a utilização da ELI para reversão de intoxicações, porém, uma vez que frequentemente a dose e a taxa utilizadas superam a indicada na NPT, é possível que a escassez de relatos seja devido à subnotificação ou falha na detecção dos efeitos adversos. A real incidência de efeitos adversos pela utilização da ELI como antídoto ainda é incerta, e muitas vezes os possíveis efeitos colaterais são extrapolados das reações causadas pela NPT com ELI (HAYES et al., 2016; LESKIW; WEINBERG, 2009).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a administração da ELI (Lipovenos[®] MCT 20%¹) interfere no efeito do DZ, e determinar se o protocolo utilizado é seguro quando feito em associação, ou não, ao benzodiazepínico. Por meio de exame físico geral e neurológico completo, foi observado se há reversão ou atenuação do efeito sedativo do fármaco, ou redução do tempo necessário para recuperação. Estes exames, juntamente com análises laboratoriais hematológicas e histopatológicas, demonstram se a ELI pode gerar efeitos deletérios nestes animais, causando alterações clínicas, sanguíneas ou teciduais. Estes resultados podem permitir a formulação de recomendações mais precisas sobre a administração concomitante destes agentes.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Protocolo 307/2018).

2.2.1 GRUPOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 30 coelhos machos, adultos, Nova Zelândia, com aproximadamente 3 a 4 kg (próximo a 150 dias de vida), provenientes da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da EV-UFMG, no município de Igarapé (MG).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=6) (Quadro 2.1), e mantidos em gaiolas metálicas individuais (aproximadamente 75 cm de comprimento por 30 cm de largura e 45 cm de altura). Água e ração comercial² foi oferecida *ad libitum*. Um período mínimo de 7 dias após a chegada dos animais foi estabelecido antes de qualquer manipulação experimental, para que estes pudessem se aclimatizar ao novo ambiente.

A primeira coleta das amostras de sangue para realização dos exames laboratoriais (hemograma e perfil bioquímico) foi realizada em todos os animais uma semana antes do início dos procedimentos experimentais, por meio de cateterização da artéria auricular, e este foi referido como o valor basal destes animais.

¹ Lipovenos[®] MCT 20%, Fresenius Kabi Áustria GmbH, Graz, Áustria.

² Ração Do Campo Coelhos (Presence, São Paulo, Brasil).

Quadro 2.1 – Diferentes desafios e tratamentos realizados em cada grupo experimental.

Grupo	Desafio	Tratamento
DZ	Diazepam, 1 mg/kg (0,2 mL/kg), IV.	-
DZxR	Diazepam, 1 mg/kg (0,2 mL/kg), IV.	Ringer Lactato (1,5 mL/kg + 0,25 mL/kg/min durante 30 min, IV).
DZxELI	Diazepam, 1 mg/kg (0,2 mL/kg), IV.	ELI 20% (1,5 mL/kg + 0,25 mL/kg/min durante 30 min, IV).
ELI	NaCl 0,9% (0,2 mL/kg), IV.	ELI 20% (1,5 mL/kg + 0,25 mL/kg/min durante 30 min, IV).
R	NaCl 0,9% (0,2 mL/kg), IV.	Ringer Lactato (1,5 mL/kg + 0,25 mL/kg/min durante 30 min, IV).

No dia dos procedimentos experimentais, foi obtido acesso venoso (veia auricular marginal) e arterial (artéria auricular) em todos os animais, com auxílio de cateteres³ n.22 acoplados a dispositivos PRN⁴ e fixados nas orelhas com esparadrapo, para administração dos desafios e tratamentos, e para coletas das amostras sanguíneas, respectivamente.

No tempo zero (T0), referente ao início dos procedimentos experimentais, foi realizado exame físico geral, com avaliação de mucosas, tempo de reperfusão capilar (TPC), turgor cutâneo, temperatura retal (TR), temperatura da pele (TP) interdigital e ausculta torácica. A TR e TP foram mensuradas com os sensores de temperatura (retal e de pele) do monitor multiparamétrico⁵. Monitoração invasiva da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) também foi realizada em todos os animais, com auxílio do monitor multiparamétrico acoplado ao acesso arterial, o qual também forneceu a FC. Os animais também foram submetidos a exame neurológico completo, realizado sempre pelo mesmo avaliador. Sangue arterial foi coletado em seringa heparinizada para realização de hemogasometria arterial. Em seguida, foi administrado DZ⁶ (1 mg/kg, em volume de 0,2 mL, IV) aos animais dos grupos DZ, DZxR e DZxELI. Os animais dos grupos ELI e R receberam, ao invés do DZ, volume equivalente (0,2 mL/kg) de solução NaCl 0,9%⁷, IV. Após um intervalo de 10 minutos (T1) os animais foram submetidos a novo exame físico geral, exame neurológico e monitoração da pressão arterial. Nesse momento, os animais dos grupos DZxR e R receberam

³ Catéter Intravenoso BD Insyte™, Becton Dickison Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

⁴ BD PRN Adapter Luer-Lock, Becton Dickison Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

⁵ Monitor de Sinais Vitais BM5, Bionet Co. Ltda, Seoul, Coréia do Sul.

⁶ Compaz® (Diazepam) solução injetável 5 mg/ml, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil.

⁷ Cloreto de sódio a 0,9%, Fresenius Kabi Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

solução ringer com lactato⁸ por via IV (*bolus* inicial de 1,5 mL/kg seguido de infusão contínua na taxa de 0,25 mL/kg/min durante 30 minutos) enquanto os dos grupos DZxELI e ELI receberam ELI 20% (Lipovenos[®] MCT 20%) na mesma dose. A dose e o tempo de administração da ELI se encontravam dentro das recomendações feitas por FERNANDEZ et al. (2011), que sugeriram *bolus* inicial de 1,5 a 4,0 mL/kg, administrado em um período de 1 minuto, seguido de infusão contínua na taxa de 0,25 mL/kg/min durante 30 a 60 minutos. Os animais do grupo DZ não receberam tratamento. Após os 30 minutos (T2), novo exame físico geral e neurológico foi realizado, além de monitoração da pressão arterial, e assim sucessivamente em intervalos de 20 minutos por mais três vezes (T3, T4 e T5) (Figura 2.1). No momento T5, também foi realizada hemogasometria arterial e coleta de sangue para exames hematológicos e bioquímicos. Desta forma, os animais foram monitorados por um total de 100 minutos, e então eutanasiados com aprofundamento do plano anestésico com anestesia inalatória (isoflurano) e administração IV de cloreto de potássio. Foi realizada necropsia de todos os animais imediatamente após a eutanásia, e amostras teciduais (fígado, pâncreas, rim e pulmão) foram coletadas para análise histopatológica e por microscopia eletrônica.

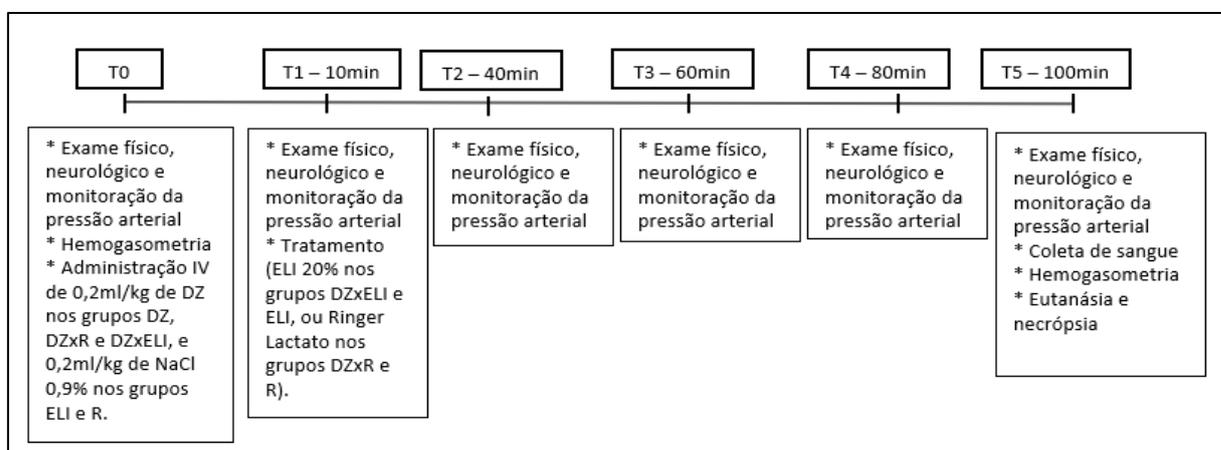


Figura 2.1 - Linha do tempo dos procedimentos experimentais realizados.

É importante ressaltar que o intervalo inicial (entre T0 e T1) foi determinado de acordo com os achados de KAUR e KIM (2008), em que a concentração encefálica máxima de DZ ocorreu 10 minutos após a administração IV de 1 mg/kg do fármaco. A dose de DZ administrada (1 mg/kg) foi baseada na dose sedativa (1 – 2 mg/kg) e antiepiléptica (0,5 – 2 mg/kg)

⁸ Solução Ringer com Lactato, Fresenius Kabi Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

preconizada para coelhos (DECUBELLIS, 2016; HARCOURT-BROWN, 2004; KEEBLE, 2006; VARGA, 2013b).

A escolha da solução ringer com lactato como o controle foi baseada na sua osmolaridade e no seu pH, que se aproximam mais da ELI 20% em relação à solução de cloreto de sódio 0,9% (Quadro 2.2).

Quadro 2.2 – Comparação da osmolaridade (mOsm/L) e do pH entre as soluções de Lipovenos[®] MCT 20%, Ringer Lactato e Cloreto de Sódio (0,9%).

Produto	Osmolaridade (mOsm/L)	pH
Lipovenos[®] MCT 20%	273	6,5 - 8,7
Ringer Lactato	273	6,0 – 7,0
Cloreto de Sódio 0,9%	308	4,5 – 7,0

2.2.2 ANÁLISES CLÍNICAS

2.2.2.1 AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA

O exame neurológico foi realizado assim como descrito por MANCINELLI (2015), sendo feito sempre pelo mesmo avaliador. Também foi observado o comportamento dos animais de explorar o ambiente. Para a comparação objetiva do estado neurológico dos animais nos diferentes grupos, foi criada uma ficha de pontuação adaptada de BAKER et al. (1991) e RAEKALLIO et al. (2002) (Quadro 2.3). Nela, seis níveis de avaliação foram considerados: estado mental, postura, marcha, comportamento, avaliação de nervos cranianos, e avaliação das reações posturais e do tônus muscular. Os escores desta pontuação variaram de 0 a 82, e quanto maior a pontuação, maiores os déficits neurológicos. Desta forma, um animal com exame neurológico normal apresentava escore em cada um destes níveis, e escore total, igual a zero. Exame neurológico normal foi atestado em todos os animais em T0, antes da administração do DZ ou NaCl 0,9%.

Quadro 2.3 - Ficha de pontuação neurológica adaptada de BAKER et al. (1991) e RAEKALLIO et al. (2002).

PARÂMETRO	PONTUAÇÃO
Estado Mental	<ul style="list-style-type: none"> • Normal: 0 • Obnubilado: 5 • Estupor: 10 • Coma: 25 <p style="text-align: right;">Total Máximo: 25</p>
Postura	<ul style="list-style-type: none"> • Normal: 0 • Decúbito esternal com cabeça elevada: 1 • Decúbito esternal com cabeça baixa: 2 • Decúbito lateral: 3 <p style="text-align: right;">Total Máximo: 3</p>
Marcha	<ul style="list-style-type: none"> • Normal: 0 • Ataxia mínima: 5 • Ataxia moderada: 10 • Se mantém em estação, mas não caminha: 15 • Não consegue se manter em estação: 20 • Paralisia: 25 <p style="text-align: right;">Total Máximo: 25</p>
Comportamento	<ul style="list-style-type: none"> • Explora o ambiente: 0 • Não explora o ambiente: 5 <p style="text-align: right;">Total Máximo: 5</p>
Nervos Cranianos	<ul style="list-style-type: none"> • Reflexo pupilar à luz – Normal: 0; Alterado: 1 • Reflexo oculocefálico – Normal: 0; Reduzido: 1; Ausente: 2 • Reflexo palpebral – Normal: 0; Reduzido: 1; Ausente: 2 • Reflexo corneano – Normal: 0; Alterado: 1 • Sensibilidade facial – Normal: 0; Reduzida: 1; Ausente: 2 • Nistagmo patológico – Ausente: 0; Presente: 1 <p style="text-align: right;">Total Máximo: 9</p>
Reações Posturais e Tônus Muscular	<ul style="list-style-type: none"> • Reflexo de endireitamento* – Normal: 0; Presente, porém lento: 5; Ausente: 10 • Saltitamento membros torácicos – Normal: 0; Reduzido: 1; Ausente: 2 • Saltitamento membros pélvicos – Normal: 0; Reduzido: 1; Ausente: 2 • Tônus muscular – Normal: 0; Reduzido: 1 <p style="text-align: right;">Total Máximo: 15</p>

* O reflexo de endireitamento não é realizado durante a avaliação neurológica de cães e gatos, porém faz parte do exame neurológico completo de coelhos. Para a sua realização o animal é colocado em decúbito lateral e observa-se a sua capacidade de retornar, de forma rápida, à sua posição normal (MANCINELLI, 2015).

É importante ressaltar que os animais não apresentaram resposta durante a avaliação da resposta à ameaça e da reação posicional propioceptiva consciente. A avaliação do posicionamento tátil foi considerada muito variável e não confiável, pois eram necessárias várias repetições para a obtenção de resposta adequada e, mesmo assim, alguns animais permaneciam com aparente déficit, inclusive durante a avaliação em T0 e em animais dos

grupos controle. Segundo VERNAU, OSOFSKY e LECOUTEUR (2007), por serem presas, coelhos neurologicamente normais podem não responder a estes três testes quando em situações de estresse. Estes são avaliados somente quando os animais estão muito calmos e confortáveis durante a manipulação. Entretanto, os animais utilizados no presente estudo não eram acostumados a este tipo de manipulação. O tônus mandibular e da língua também foram considerados de difícil avaliação, assim como já relatado anteriormente (VERNAU; OSOFSKY; LECOUTEUR, 2007).

O reflexo flexor, reflexo patelar, deglutição e sensibilidade (superficial e profunda) se mantiveram normais em todas as avaliações, sem alteração após a instituição dos diferentes tratamentos. Desta forma, nenhum destes parâmetros foi incluído na pontuação neurológica.

2.2.2.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

Nos tempos basal e T5 foi realizada coleta de amostra de sangue com auxílio de cateter fixo na artéria auricular. Foram coletados 3,0 mL de sangue em cada momento (valor de acordo com o National Center For The Replacement Refinement & Reduction Of Animals In Research (2019). Desta amostra, 1,5 mL foram acondicionados em tubo com EDTA⁹ para realização de exames hematológicos em aparelho de contagem eletrônica¹⁰. Foram determinados a contagem total de hemácias (RBC), leucócitos e plaquetas, hematócrito (HCT), concentração de hemoglobina (HB) e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Foram realizados, também, esfregaços sanguíneos para contagem diferencial dos leucócitos e observação da presença de alterações morfológicas celulares e agregados plaquetários. O restante do sangue (1,5 mL) foi acondicionado em um tubo sem anticoagulante¹¹ para centrifugação (4.000 rpm durante 8 minutos) e separação do soro. Este foi utilizado para realização da avaliação bioquímica, composta pela análise da atividade sérica da amilase, ALT, AST, FA e gama-glutamil transferase (GGT), e dosagem sérica de creatinina, ureia, glicose, TG, colesterol, PT e albumina. As análises bioquímicas foram realizadas com kits laboratoriais Kovalent[®] em analisador bioquímico¹².

⁹ Vacutube EDTA.K3 a 15%, Biocon[®] Diagnósticos, Minas Gerais, Brasil.

¹⁰ Analisador hematológico veterinário Sysmex pocH-100iV Diff[®], Sysmex do Brasil Ltda, Paraná.

¹¹ Vacutube ativador de coágulo, Biocon[®] Diagnósticos, Minas Gerais, Brasil.

¹² Analisador bioquímico Cobas Mira Plus[®], Roche Diagnóstico Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

Nos tempos T0 e T5, também foi coletado 0,6 mL de sangue arterial, com seringa contendo heparina lítica, para realização de hemogasometria arterial¹³.

A avaliação histopatológica foi realizada após as amostras de fígado, pulmão, rim e pâncreas serem fixadas em formol a 10%, com posterior processamento por técnica rotineira de inclusão em parafina e cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina. A avaliação por microscopia eletrônica foi realizada após as amostras de fígado e pâncreas serem fixadas em solução de Karnovsky e mantidas, após 24 a 48 horas, em solução PBS.

2.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O número de animais escolhido foi o número mínimo necessário para a realização de estudo estatístico adequado. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com medidas dos tratamentos repetidas no tempo para um mesmo animal.

As variáveis referentes ao exame neurológico não se adequavam às premissas da análise de variância, e foram avaliadas para comparação de tratamentos por meio do teste de Kruskal-Wallis dentro de cada tempo, ou pelo teste de Friedman para comparação de tempos dentro de tratamento. Posteriormente, o teste post-hoc de Conover foi aplicado quando observado efeito significativo.

Para avaliação das variáveis do exame físico geral, hemogasometria, análise bioquímica e hematologia foi ajustado modelo misto considerando o animal como efeito aleatório e os efeitos de tratamento e tempo como fixos. Análise de variância foi utilizada para analisar o efeito de tempo e grupo, além da interação entre eles. As médias de quadrados mínimos foram então comparadas por meio do teste de Tukey. As variáveis que não se adequavam às premissas da análise de variância foram avaliadas para comparação de tratamentos por meio do teste de Kruskal-Wallis dentro de cada tempo, ou pelo teste de Friedman para comparação de tempos dentro de tratamento. Posteriormente, o teste post-hoc de Conover foi aplicado quando observado efeito significativo. Para a variável “agregados plaquetários” foi utilizado teste de Wilcoxon para avaliar o efeito do tempo dentro de cada grupo. A variável “plaquetas ativadas” foi analisada pelo Teste Exato de Fisher para a avaliação da sua presença entre os grupos dentro de cada tempo, e o teste de McNemar para avaliar a presença entre os tempos dentro de cada grupo.

¹³ Hemogômetro ABL800 Basic Analyser, Radiometer®, Copenhagen, Dinamarca.

Em todas as avaliações o nível de significância estabelecido foi de 0,05. As avaliações foram realizadas por meio do software R (R Core Team, 2019).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA

Em T0, todos os animais apresentaram exame neurológico normal (pontuação zero). Dentro dos grupos ELI e R não houve qualquer variação entre os tempos, o que demonstra que a ELI e o ringer lactato não causaram alterações no estado neurológico dos animais (Tabela 2.1). De forma similar, HILLER et al. (2010) negaram a ocorrência de alterações no sistema neurológico, como excitação ou alterações motoras, após a administração IV de 20, 40, 60 e 80 mL/kg de ELI 20% em 30 minutos em ratos anestesiados com isoflurano. Os animais que receberam 80 mL/kg de ELI manifestaram discreta letargia horas após terem se recuperado da anestesia. LIANG, YANG e HO (2012) associaram a ocorrência de catatonia em um homem à administração de ELI, porém é possível que esta manifestação tenha ocorrido devido ao estado crítico prévio do paciente, e não pela infusão da emulsão.

Tabela 2.1 - Mediana (md), valor mínimo (mín) e valor máximo da pontuação total obtida durante avaliação neurológica dos coelhos dos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R em cada tempo (T0 a T5).

	DZ			DZxR			DZxELI			ELI			R		
	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx
T0	0B	0	0	0B	0	0	0C	0	0	0	0	0	0	0	0
T1	51Aa	42	58	48,5Aa	44	54	48,5Aa	40	52	0b	0	0	0b	0	0
T2	37Aa	18	46	30,5Aa	13	53	25,5Aa	17	47	0b	0	0	0b	0	0
T3	15Aa	7	26	17Aa	2	46	10BCa	6	35	0b	0	0	0b	0	0
T4	9ABa	1	18	11ABa	0	26	10BCa	0	30	0b	0	0	0b	0	0
T5	2ABa	0	13	7,5ABab	0	14	3,5BCa	0	21	0b	0	0	0b	0	0

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelos testes de Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos em cada tempo e de Friedman para comparação entre os tempos dentro de cada grupo ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

A partir de T1, houve diferença significativa entre os grupos que receberam DZ (DZ, DZxR e DZxELI) e os que não receberam (ELI e R). Todos os animais medicados com o benzodiazepínico apresentaram logo após a sua administração depressão do estado mental,

alteração na postura, déficits em nervos cranianos, redução do tônus muscular, déficit das reações posturais, alterações na marcha e alteração comportamental (Figura 2.2), enquanto os animais dos grupos ELI e R permaneceram com estado neurológico normal. As alterações observadas após a administração de DZ estavam de acordo com o descrito na literatura (BOOTHE, 1998; BRADSHAW; PLEUVRY, 1971; CRESTANI et al., 2001; MOHAMMED; SAYED; ABDELNABI, 2011).



Figura 2.2 - Coelho em decúbito lateral, com estado mental deprimido e ausência do reflexo de endireitamento após administração de DZ (1,0 mg/kg, IV). Fonte: Arquivo Pessoal.

A alta lipossolubilidade do DZ permite a sua ampla e rápida distribuição no SNC, atingindo rapidamente concentrações terapêuticas e, conseqüentemente, tendo início rápido da sua ação (BOOTHE, 1998). Os receptores de GABA são amplamente distribuídos no encéfalo, com alta concentração no córtex, hipocampo, tálamo, gânglio basal e cerebelo. Desta forma, agentes que interagem com estes receptores tendem a afetar múltiplas regiões encefálicas (YOUNG; CHU, 1990). Os receptores GABA_A também estão presentes em diferentes regiões da medula espinhal, em especial na substância cinzenta (MALCANGIO; BOWERY, 1996). A redução do tônus muscular observada é atribuída primariamente à ligação do fármaco aos receptores do subtipo α_2 -GABA_A, altamente expressado na medula espinhal (CRESTANI et al., 2001).

O principal efeito clínico gerado pelo DZ é a sedação (BOOTHE, 1998), que pode ocorrer em diferentes graus. Coelhos Nova Zelândia medicados com 2,5 mg/kg (IM) de DZ

permaneceram conscientes, responsivos a estímulos, movimentando a cabeça e tentando levantar (MOHAMMED; SAYED; ABDELNABI, 2011). No presente estudo, porém, a maior parte dos animais apresentou na primeira avaliação após a administração do fármaco sedação mais profunda com estado mental deprimido, permanência em decúbito lateral, sem movimentar a cabeça e sem tentar levantar, apesar da utilização de dose mais baixa (1 mg/kg). Esta diferença se deve, provavelmente, à via de administração utilizada (IV).

Com o passar do tempo, houve melhora progressiva do estado neurológico dos animais, sendo que alguns retornaram ao estado inicial (exame neurológico normal). Porém, não houve diferença entre os grupos DZ, DZxR e DZxELI durante todo o experimento, o que sugere que os tratamentos instituídos com ringer lactato ou ELI não interferiram na manifestação, progressão e recuperação dos efeitos causados pelo DZ. De forma similar, coelhos anestesiados com tiopental e tratados com ELI não apresentaram diferença na duração da anestesia em relação aos tratados com NaCl 0,9%. Entretanto, logo após os tratamentos, os animais que receberam a emulsão apresentaram em média maior depressão neurológica (aumento da profundidade da anestesia). Os autores sugeriram que a ELI resultou em maior pico da concentração encefálica do tiopental (KAZEMI et al., 2011). Por outro lado, RUSSEL e WESTFALL (1962) relataram redução significativa do tempo de anestesia por tiopental em ratos que receberam por via IV emulsão gordurosa a base de óleo de milho ou de semente de algodão. É possível que a discordância entre estes estudos seja devido às espécies envolvidas, além das diferentes doses e composições das emulsões utilizadas.

Apesar da tendência geral nos grupos DZ, DZxR e DZxELI de melhora progressiva do estado neurológico a partir de T1, um animal do grupo DZxELI (coelho A53) apresentou queda inicial na pontuação entre T1 e T3, seguida de piora na avaliação neurológica (aumento da pontuação total) em T4 mantida até o final do tempo experimental (Figura 2.3). Vale acrescentar que este animal apresentou as menores mensurações de PAS, PAD e PAM de T3 a T5, estando abaixo do limite inferior estabelecido para coelhos (hipotensão), e em T4 e T5 ele ficou ofegante. Em T5 foi observado que o animal apresentava potencial hidrogeniônico (pH) igual a 7,32, íon bicarbonato (HCO_3^-) igual a 22,8 e pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) igual a 35,6. Desta forma, este animal apresentava acidemia, e é possível que a hiperventilação tenha ocorrido como tentativa de compensar o pH baixo. Estes parâmetros serão mais discutidos a frente. Por outro lado, não foram observadas alterações dignas de nota nas avaliações histopatológicas realizadas (descritas e discutidas ao final deste capítulo), tendo somente moderada degeneração vacuolar hepática.

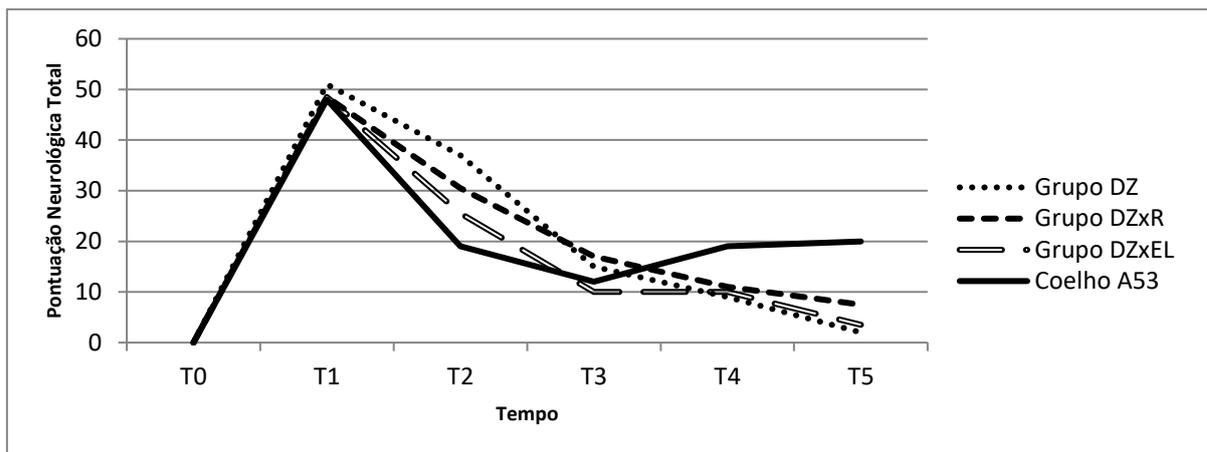


Figura 2.3 - Gráfico da progressão da pontuação total obtida durante a avaliação do animal A53 em comparação com as medianas dos grupos DZ, DZxR e DZxELI. Enquanto a tendência geral dos grupos DZ, DZxR e DZxELI foi de melhora progressiva do estado neurológico a partir de T1, o animal A53 do grupo DZxELI apresentou piora em T4, que se manteve até o final da observação experimental.

A possibilidade de retorno dos sinais clínicos ou manifestação mais tardia após a administração de ELI no tratamento de intoxicações por agentes lipossolúveis já foi relatada. MCALLISTER et al. (2012) descreveram sobredose acidental do antipsicótico altamente lipossolúvel Onlanzapina em uma criança de 4 anos que apresentava taquicardia, depressão do estado mental e mínima resposta a estímulo nocivo. Pouco tempo após a administração de *bolus* de 1,5 mL/kg de ELI 20%, seguido de infusão na taxa de 0,25 mL/kg/min, o paciente apresentou melhora da FC (queda de 170bpm para 115bpm) e ficou mais responsivo. Transcorridos 45 minutos do término da infusão, foi observada recorrência da sintomatologia inicial, a qual foi controlada com nova administração de ELI, sem maiores intercorrências. MARWICK et al. (2009) relataram crises epilépticas, apneia e assistolia em um paciente humano após administração acidental de bupivacaína por via IV. Tratamento imediato com medidas de reanimação cardio-pulmonar e infusão de ELI 20% (*bolus* de 2,08 mL/kg em 90 segundos seguido de 0,16 mL/kg/min durante 30 minutos) resultou em resposta adequada, porém 40 minutos após o término da infusão foi observado novo episódio de cardiotoxicidade.

Para avaliar as possíveis causas destas ocorrências, é importante lembrarmos do tempo de meia-vida das substâncias envolvidas. Segundo KLOTZ et al. (1976), a meia-vida de eliminação do DZ em coelhos é de 2,7 horas (162 minutos), enquanto JEPPSSON (1976) relata meia-vida plasmática do DZ igual a 107 ± 7 minutos, e do DMDZ igual a 409 ± 109 minutos. Por outro lado, coelhos que receberam 1 mL de ELI 10%, composta por óleo de soja e emulsificada com lecitina de ovo, apresentaram meia vida de eliminação sanguínea de 5

minutos (ILLUM et al., 1989). Vale ressaltar que a eliminação de emulsões que apresentam na sua composição MCT, como a utilizada no presente trabalho, tende a ser mais rápida do que as que apresentam somente LCT (HIPALGAONKAR et al., 2010; JOHNSON et al., 1990; WAITZBERG et al., 2006).

A discrepância entre a meia-vida dos lipídios provenientes da ELI e do fármaco envolvido, assim como sugerido por JEPPSSON E RÖSSNER (1975), pode levar à rápida liberação do fármaco das partículas de gordura. Uma vez que é esperado que a ELI apresente meia-vida de eliminação menor do que o DZ, ao ser metabolizada, o fármaco de maior meia-vida (DZ) volta a circular livremente, estando disponível para nova interação tecidual e correspondente efeito farmacológico. Consequentemente, pode haver recorrência da manifestação clínica.

O efeito de partição, associado à aceleração da redistribuição, também pode contribuir para estas ocorrências. Uma paciente intoxicada por amitriptilina apresentou aumento considerável da concentração plasmática do fármaco após o tratamento com ELI (aumento de 2718 mg/mL para 4946 mg/mL), possivelmente devido ao favorecimento da movimentação do fármaco para o compartimento vascular (LEVINE et al., 2012).

Desta forma, apesar da ELI não ter afetado a manifestação clínica gerada pelo DZ na maioria dos coelhos, o protocolo utilizado pode ter resultado em manutenção de níveis plasmáticos mais altos do fármaco devido ao efeito de partição e diferença entre a meia-vida de eliminação da ELI e do DZ. Este último, ficaria disponível para novo equilíbrio e interação com o encéfalo. Para a avaliação definitiva desta possibilidade, é necessária mensuração seriada da concentração plasmática do DZ em coelhos, além da concentração encefálica final. Este tipo de ocorrência apoia a recomendação de monitoração minuciosa do paciente por várias horas após a infusão de ELI, mesmo quando há aparente melhora clínica inicial (WEINBERG, 2012).

A ação da ELI no efeito antiepiléptico do DZ não foi avaliada neste experimento, uma vez que crises epilépticas não foram induzidas nos coelhos devido às restrições éticas e de bem-estar animal. Porém, com base na ausência de efeito da ELI sobre a ação sedativa do DZ, sugere-se que a infusão realizada também não apresenta efeito sobre a ação antiepiléptica do fármaco. É possível que em situações de sobredose do benzodiazepínico, ao invés de doses terapêuticas, os efeitos observados sejam diferentes. LITONIUS et al. (2012), por exemplo, não observaram efeito de sequestro na presença de dose não tóxica de bupicavaina, e FETTIPLACE et al. (2015) e DUREAU et al. (2016) também sugeriram que a partição ocorre preferencialmente em

maiores concentrações teciduais. Desta forma, outros estudos são necessários para a avaliação da utilização da ELI no tratamento de intoxicações por overdose destes fármacos.

2.3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA GERAL

Para a monitoração do estado clínico geral, foram avaliados a coloração das mucosas ocular e oral, TPC, ausculta pulmonar, FC, PAS, PAD, PAM, TR, TP e a diferença entre TR e TP (Delta-T). Os valores de referência da FC, PAS, PAD, PAM e TR de coelhos estão no Quadro 2.4. Não foi observada diferença significativa no momento T0 entre os grupos em nenhum desses parâmetros. A coloração das mucosas, TPC e a ausculta pulmonar se mantiveram normais durante todo o experimento.

Quadro 2.4 - Intervalo de referência da TR, FC, PAS, PAD e PAM em coelhos.

Parâmetro Clínico	Intervalo de referência
TR (°C)	38,50 – 41,10 ^{a,b}
FC (bpm)	180 – 300 ^{b,c}
PAS (mmHg)	90 – 130 ^b
PAD (mmHg)	80 – 90 ^b
PAM (mmHg)	83 – 103 ^d

Fontes: ^A LEE (1939); ^b SUCKOW e SCHROEDER (2012); ^c DONNELLY (1997); ^d Calculado a partir dos valores médios de PAS e PAD em SUCKOW e SCHROEDER (2012).

2.3.2.1 TEMPERATURA RETAL, TEMPERATURA DA PELE E DELTA-T

Estudos da temperatura apresentam grande valia na avaliação do estado circulatório. Variações nas temperaturas podem ser mais sensíveis a alterações circulatórias, precedendo a alteração de outros parâmetros, como da pressão sanguínea (BROCK; SKINNER; MANDERS, 1975; KHOLOUSSY et al., 1980).

No grupo DZxR foi observada queda significativa da TR em relação a T0 a partir de T2 até o final da avaliação. A partir de T3 no grupo DZ, e a partir de T4 no grupo DZxR, a TR também se tornou estatisticamente menor do que a dos grupos que não receberam DZ (ELI e R) (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Média e desvio padrão da TR (°C) em T0 a T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	40,0±0,7	40,4±0,4 _A	40,2±0,3	40,2±0,6	40,2±0,6
T1	39,7±0,8	39,9±0,5	39,9±0,3	40,1±0,5	40,1±0,5
T2	39,4±0,8	39,6±0,4 _B	39,7±0,8	40,3±0,5	40,4±0,2
T3	39,3±0,8 _b	39,5±0,3 _B	39,8±0,6	40,3±0,6 _a	40,3±0,3 _a
T4	39,5±1,0 _b	39,5±0,2 _{Bbc}	40,0±0,4	40,5±0,6 _a	40,4±0,4 _{ac}
T5	39,5±1,0 _b	39,4±0,3 _{Bb}	40,0±0,8	40,7±0,4 _a	40,4±0,4 _a

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de TR em coelhos: 38,50 – 41,10°C (Fonte: LEE, 1939; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Sugere-se que DZ causou discreta redução da TR. A manipulação dos animais pode estressá-los e, conseqüentemente, aumentar a TR. LUZI et al. (2007) observaram aumento médio de 0,5°C na TR de coelhos submetidos a estresse (contenção durante 15 minutos). Os animais sedados, desta forma, tendem a ter uma redução da temperatura, assim como foi observado neste experimento. Mesmo com esta redução, os animais mantiveram a temperatura dentro do valor de referência normal para coelhos (Quadro 2.4). Ao contrário destes resultados, MOHAMMED, SAYED e ABDELNABI (2011) não observaram alteração na TR em coelhos medicados com 2,5 mg/kg de DZ (IM). Porém, pela descrição destes autores, os animais apresentavam nível de sedação inferior ao obtido no presente estudo.

Entretanto, não houve diferença em todos os tempos entre os grupos que receberam DZ. A partir de T3, foi observada diferença significativa entre o grupo DZ e os grupos ELI e R, com menor temperatura no primeiro grupo. Em T4 e T5 essa diferença também pode ser observada entre DZxR e os grupos ELI e R. Não foi observada variação da TR dentro dos grupos ELI e R (Tabela 2.2). A ausência de diferença entre os grupos DZ, DZxR e DZxELI demonstrou que os tratamentos com ELI e ringer lactato não interferiram na queda da temperatura causada pelo DZ. A ELI e o ringer lactato também não causaram, por si só, alteração na TR, como foi evidenciado pelo fato de todos os tempos dentro dos grupos ELI e R terem apresentado valores estatisticamente iguais.

A manutenção da temperatura nos grupos tratados com ELI também é importante na avaliação da ocorrência de reações anafiláticas imediatas, que geralmente cursam com hipertermia, além de outras alterações como erupções cutâneas, edema de glote e hipotensão

(GHATAK; SAMANTA; BARONIA, 2014). Desta forma, nenhum dos animais apresentou hipertermia sugestiva de hipersensibilidade.

A TP pode ser utilizada como indicador de estresse e vasoconstrição periférica (LUZI et al., 2007). LUZI et al. (2007) observaram TP média de 35,3°C com mensuração no pavilhão auricular de coelhos por termografia infravermelha, com queda para 34,8°C após estresse. No atual experimento, não foi possível realizar mensuração no pavilhão auricular devido aos acessos venosos e arteriais na região, o que pode justificar os valores mais altos encontrados, próximos de 36° C (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Média e desvio padrão da TP (°C) em T0 a T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	35,3±1,9	36,2±0,5	36±0,4 _B	36,3±1,1	36,5±1,1
T1	36,0±0,8	37,0±0,6	36,7±0,4	37,0±1,0	36,0±0,7
T2	35,7±0,7	36,3±0,4	36,3±1,0	35,9±1,2	36,5±0,5
T3	35,8±1,0	36,2±0,7	37,1±0,9	36,4±0,3	36,4±0,8
T4	35,8±1,0	35,8±0,6	36,6±0,8	36,5±0,7	36,5±0,7
T5	35,3±1,9 ^a	36,1±0,6	37,3±0,6 _{Ab}	35,9±0,7	36,4±0,7

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

Modificações significativas da TP não foram observadas nos grupos DZ, DZxR, ELI e R durante as monitorações realizadas, enquanto no grupo DZxELI foi observado aumento entre os tempos T0 e T5. Apesar deste aumento em T5, ele somente foi estatisticamente maior do que o grupo DZ, não sendo suficiente para gerar diferença com os demais grupos, inclusive os controles (ELI e R). Desta forma, é possível que esta mudança não tenha significado clínico.

Para a adequada avaliação destes valores, é importante comparar a diferença entre a TR e a TP (Delta-T). O Delta-T reflete o gradiente entre a temperatura central, avaliada pela TR, e a periférica, aferida pela TP, e sua utilização é mais adequada para o reconhecimento de vasoconstrição periférica, ao invés da avaliação da TR ou TP individualmente (BROCK; SKINNER; MANDERS, 1975). Em humanos, considerou-se normal Delta-T de 3 a 4° C (KHOLUSSY et al., 1980).

No tempo T1, os coelhos avaliados apresentaram variação de Delta-T de 1,2 a 8,1°C, e apenas 12 animais (40%) apresentavam neste momento valores entre 3 e 4°C. Sugere-se que em coelhos o Delta-T é maior do que o relatado para humanos e cães. Em gatos, o gradiente médio entre a temperatura central (retal) e a periférica (coxim palmar, plantar ou região medial do rádio) encontrado por MORAIS (2016) foi de 8°C. Esta diferença possivelmente ocorre devido ao alto nível de estresse destes animais, assim como os coelhos, resultando em maior vasoconstrição em condições normais (MORAIS, 2016).

O Delta-T não foi significativamente alterado nos grupos DZ, DZxR e R, mas no grupo DZxELI T0 foi diferente de T3 e T5 e, no grupo ELI, T1 foi diferente de T5 (Tabela 2.4). Porém, enquanto no grupo DZxELI houve redução de Delta-T em T3 e T5 em relação a T0, no grupo ELI o Delta-T em T5 foi maior em comparação a T1 e permaneceu estatisticamente igual a T0. É importante ressaltar que em nenhum momento os grupos DZxELI e ELI foram estatisticamente diferentes do controle negativo (grupo R). Desta forma, acredita-se que as variações observadas não refletem efeitos causados pela ELI.

Tabela 2.4 - Média e desvio padrão de Delta-T (°C) em T0 a T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	4,2±0,6	4,7±1,8	4,1±0,4 _A	3,9±0,9	3,7±1,7
T1	3,6±0,9	2,9±0,6	3,2±0,6	3,1±1,0 _B	4,1±0,8
T2	3,8±0,6	3,4±0,8	3,3±1,4	4,3±0,9	3,8±0,6
T3	3,5±0,9	3,4±0,8	2,7±1,3 _B	3,9±0,6	3,9±1,0
T4	3,7±0,5	3,6±0,6	3,4±0,7	4,1±0,3	3,9±0,8
T5	4,1±1,2	3,3±0,8 _a	2,7±0,9 _{Bb}	4,8±1,0 _{Aa}	4,0±0,8

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

Relatos sugeriram que a ELI resulta em vasoconstrição periférica. Após a administração de 6 mL/kg de ELI (Intralipid® 10%) em crianças, neonatos ou prematuros foi observada redução do fluxo sanguíneo periférico e foi sugerida vasoconstrição periférica (KESSLER et al., 2005). A associação de ELI (40 mL em *bolus* seguido de infusão de 1 mL de Intralipid® 20% durante 40 minutos) e heparina (5000 IE) em suínos resultou em redução da perfusão regional e aumento da resistência vascular em diferentes tecidos (pele, tecido adiposo,

musculatura esquelética, rim, trato gastrointestinal, tireoide e pâncreas) que normalizava junto ao retorno da concentração de TG a níveis basais (BÜLOW; MADSEN; HØJGAARD, 1990). Por outro lado, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que com o protocolo utilizado não há efeito vasoconstritivo.

A TP depende da patência dos vasos, variando com a ocorrência de vasoconstricção ou vasodilatação, e do fluxo e pressão da circulação direcionada à pele (BROCK; SKINNER; MANDERS, 1975). Nos casos de vasoconstricção a temperatura periférica reduz e espera-se que a central aumente, o que resulta em maior Delta-T (BROCK; SKINNER; MANDERS, 1975; KHOLOUSSY et al., 1980). Desta forma, uma vez que não foi observada no grupo ELI redução da TP ou aumento do Delta-T em comparação a T0 ou ao grupo controle (R), sugere-se que o protocolo utilizado de administração da ELI não resultou em vasoconstricção.

Diferentes condições experimentais, como a formulação da ELI utilizada, dose administrada, tempo de administração, condições clínicas concomitantes ou espécies envolvidas podem contribuir para os diferentes resultados.

2.3.2.2 FREQUÊNCIA CARDÍACA

Não foi observada diferença significativa da FC entre T0 e T1 em nenhum grupo (Tabela 2.5), o que sugere que o DZ não teve ação direta sobre a FC. MOHAMMED et al. (2011) relataram redução na FC 10 minutos após a administração do fármaco (2,5 mg/kg, IM) em coelhos. Entretanto, a dose utilizada por estes autores foi superior à do presente estudo, o que pode resultar em maior ação sobre o sistema cardiovascular.

Tabela 2.5 - Média e desvio padrão da FC (bpm) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	211±22	223±23	203±46	223±31	221±31
T1	198±19 _B	189±38	178±23 _{Bb}	246±27 _a	225±20
T2	195±24 _B	188±35	175±30 _B	227±58	211±29
T3	204±35	196±48	184±20 _B	225±64	221±21
T4	218±35	217±45	193±33 _B	213±38	214±19
T5	235±39 _A	219±34	233±39 _A	247±36	219±27

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência da FC em coelhos: 180 – 300 bpm (Fonte: DONNELLY, 1997; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Ao avaliar os grupos DZ e DZxELI é possível observar que a FC em T5 foi significativamente maior do que em T1, e estatisticamente igual a T0 (Tabela 2.5). Acredita-se que esta diferença seja devido ao retorno anestésico dos animais. Estando mais conscientes em T5, pelo menor efeito sedativo do fármaco, a manipulação durante as condutas experimentais pode ter gerado maior estresse em comparação aos tempos anteriores e, com isso, resultado em aumento da FC.

A ausência de diferença estatística da FC entre todos os grupos em T2 a T5, e a igualdade em todos os tempos dentro dos grupos ELI e R, demonstram que a ELI e o ringer lactato não alteraram a FC dos animais, assim como relatado por FETTIPLACE et al. (2013) e UDELSMANN e MELO (2015). HILLER et al. (2010) também não observaram alterações na FC de ratos mesmo após a administração de 80 mL/kg de ELI 20%.

2.3.2.3 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA, PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA E PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Aumento significativo da PAS foi observado de T0 para T1 no grupo DZxR, com retorno à pressão semelhante à inicial a partir de T2. Apesar deste aumento no grupo DZxR, não foi observada diferença significativa entre os grupos durante todo o experimento (T0 a T5) (Tabela 2.6). Desta forma, é possível afirmar que o DZ não interferiu na PAS dos coelhos, assim como a associação deste fármaco com a ELI ou o ringer lactato também não resultou em mudanças neste parâmetro. Sabe-se que o DZ em doses terapêuticas resulta em mínima interferência no sistema cardiovascular, assim como observado neste experimento (FLAHERTY, 2009; MOHAMMED; SAYED; ABDELNABI, 2011). Dentro dos grupos ELI e R não houve variação significativa nos diferentes tempos.

Em todos os grupos a média dos valores mensurados estava dentro dos limites normais, o que ressalta a ausência de alterações de relevância clínica (Figura 2.4). O efeito da ELI na PAS será discutido juntamente com a PAD e PAM, ao final desta avaliação.

Tabela 2.6 - Média e desvio padrão da PAS (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	110±10	107±11 _B	111±20	108±12	108±14
T1	119±10	127±11 _A	126±12 _A	108±8	107±13
T2	110±10	114±11	115±7	109±4	106±11
T3	103±11	107±6 _B	113±18	115±15	105±11
T4	104±9	107±10 _B	110±13	110±5	104±11
T5	107±5	99±11 _B	107±11 _B	108±12	118±39

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência da PAS em coelhos: 90 – 130 mmHg (Fonte: SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

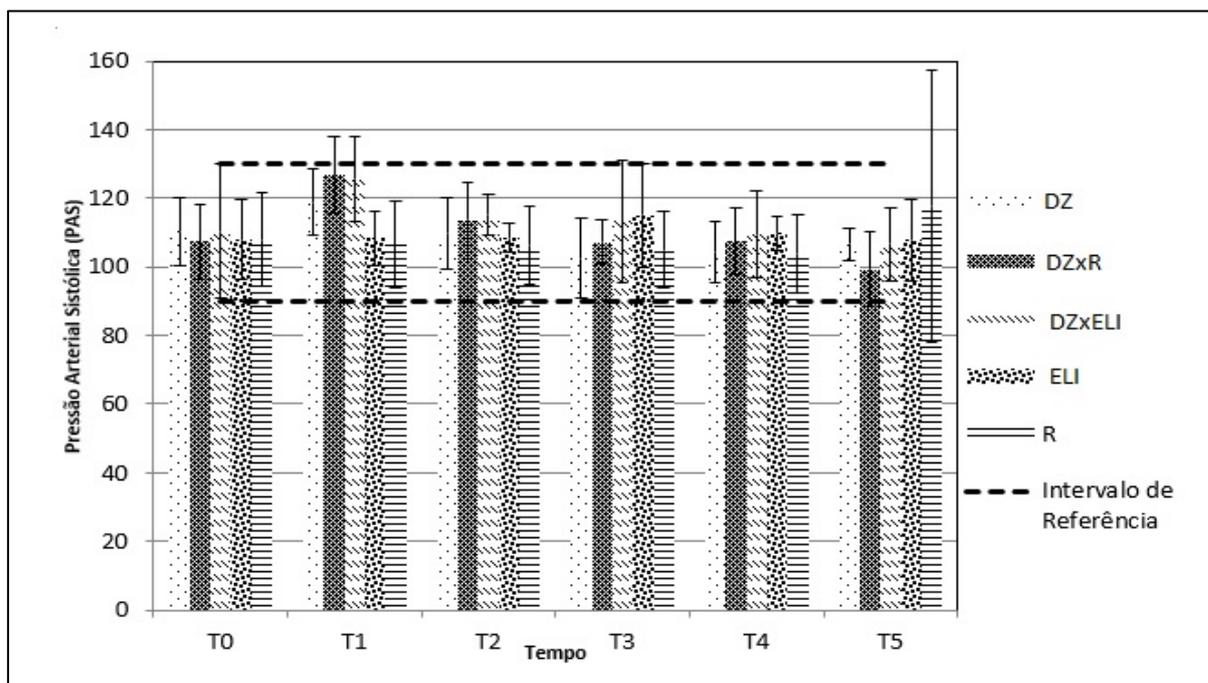


Figura 2.4. Média e desvio padrão da PAS (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R. O intervalo entre as linhas tracejadas se refere ao intervalo de normalidade da espécie.

O grupo DZ não apresentou diferença estatística na mensuração da PAD durante o experimento. Desta forma, é possível concluir que, assim como relatado com a PAS, o DZ não alterou a PAD dos coelhos. Nos momentos avaliados após as infusões (T2 a T5) foi observado que a PAD foi estatisticamente igual à mensuração inicial (T0) destes animais, além de ausência de diferença significativa entres os grupos nestes momentos. Isto demonstra que a administração das infusões (ELI ou ringer lactato), tanto nos animais medicados com DZ quanto

nos controles, não resulta em mudança da PAD. Em algumas avaliações este valor encontrava-se discretamente acima do valor máximo considerado normal para coelhos (Tabela 2.7), porém este aparente aumento também foi observado durante a avaliação basal. Desta forma, sugere-se que este achado seja devido às características naturais do grupo, sem significado clínico.

Tabela 2.7 - Média e desvio padrão da PAD (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	90±10	94±11 _B	90±19	93±10	88±20
T1	97±5	108±5 _{Aa}	102±8 _A	90±7 _b	92±14
T2	89±6	94±8 _B	96±2	94±8	85±14
T3	86±9	87±10 _B	90±14	99±15	84±10
T4	90±9	89±11 _B	88±15 _B	90±6	83±13
T5	91±6	84±9 _B	88±12 _B	91±5	88±13

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência da PAD em coelhos: 80 – 90 mmHg (Fonte: SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Não foi observada diferença estatística na PAM entre T0 e os demais tempos no grupo DZ, enquanto nos grupos DZxR e DZxELI houve aumento da PAM de T0 para T1, retornando a valores estatisticamente iguais em T2 (Tabela 2.8). Estes resultados sugerem que o DZ pode aumentar a PAM de forma transitória e variável em diferentes indivíduos. Em pacientes saudáveis, a administração de DZ pode resultar em efeito excitatório paradoxal, com hiperatividade (BOOTHE, 1998; FLAHERTY, 2009). Alguns coelhos apresentaram, imediatamente após a administração de DZ, midríase e discreta excitação com duração de poucos segundos, seguida de sedação. Nestes, foi evidente o aumento na PAS, PAD e PAM de T0 para T1. É possível que a excitação tenha causado um aumento transitório destes parâmetros e, uma vez que nem todos os animais apresentam este tipo de manifestação, este efeito não foi evidenciado em todos os grupos medicados com o fármaco. Esta reação justifica, também, a diferença significativa entre T0 e T1 da PAS e PAD observada somente no grupo DZxR.

Enquanto isso, a PAM seguiu a tendência da PAS e PAD e não foi alterada pela administração das infusões, em associação ou não ao DZ, uma vez que não houve diferença entre os grupos do momento T2 a T5 e que em todos os grupos T0 foi estatisticamente igual a T2, T3, T4 e T5. Conclui-se que a ELI não apresentou efeito sobre a PAS, PAD e PAM.

Tabela 2.8 - Média e desvio padrão da PAM (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	101±10	101±11 _B	99±17 _B	101±7	97±8
T1	109±7 _A	118±7 _{Aa}	113±10 _A	99±6 _b	99±13 _b
T2	100±8	105±9	107±4	100±6	95±13
T3	95±11 _B	98±8 _B	102±16	106±15	94±11
T4	98±9	98±10 _B	98±14 _B	97±7	94±12
T5	99±5	92±11 _B	97±11 _B	99±8	91±11

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência da PAM em coelhos: 83 – 103 mmHg (Fonte: Calculado a partir dos valores médios de PAS e PAD em SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Atualmente acredita-se que a ELI apresenta efeitos inotrópico positivo e vasoconstritivo, os quais auxiliariam na recuperação dos indivíduos intoxicados por AL (FETTIPLACE; WEINBERG, 2018). Estudos prévios sugeriram que a administração de ELI resulta em aumento da pressão arterial sanguínea e da resistência vascular periférica (vasoconstrição). Suínos anestesiados que receberam 40 mL de ELI (Intralipid® 20%) e 5000 UI de heparina em *bolus*, seguida de infusão da ELI (1 mL/min) durante 40 minutos tiveram elevação da resistência vascular em diferentes tecidos (pele, tecido adiposo, musculatura esquelética, rim, trato gastrointestinal, tireoide e pâncreas). Também foi observada elevação significativa na PAM após o início da infusão contínua. Após a normalização da concentração dos ácidos graxos livres, que tiveram seus valores elevados em aproximadamente 10 vezes pela administração da ELI, os efeitos observados foram revertidos (BÜLOW; MADSEN; HØJGAARD, 1990). Crianças e neonatos que receberam 6 mL/kg de ELI 10% em 4 horas apresentaram elevação na pressão sanguínea de aproximadamente 10% e redução de 10% no fluxo sanguíneo periférico. Sugeriu-se que a emulsão resultou em vasoconstrição arterial periférica (KESSLER et al., 2005).

A administração de 40 mL/h de ELI (Intralipid® 20%), durante 8 horas, em humanos obesos saudáveis resultou em aumento significativo da PAS e PAD (GOSMANOV et al., 2012). UDELSMANN e MELO (2015) relataram aumento da PAM em suínos que receberam *bolus* de 1,5 mL/kg seguido de 0,25 mL/kg/min durante 30 minutos e posterior 0,50 mL/kg/min durante mais 30 minutos de ELI a 20%. Foi observado pico da PAM imediatamente após a administração do *bolus* e posterior aumento com a realização da primeira infusão contínua,

permanecendo mais alta durante todo o tempo avaliado (60 minutos). A elevação foi associada primariamente ao aumento na pressão sanguínea pulmonar devido ao aumento na resistência vascular (UDELSMANN; MELO, 2015). Um estudo em ratos anestesiados que receberam três infusões sequenciais, intervaladas de 45 minutos, de 9 mL/kg de ELI 20% ou 9 mL/kg de salina em 60 segundos demonstrou maior aumento na PAS e PAD nos medicados com a infusão lipídica em comparação aos que receberam salina. Foi observado, também, aumento no fluxo aórtico, e os autores afirmaram que a ELI apresenta efeito direto inotrópico e lusitrópico positivo, os quais contribuiriam para a recuperação dos animais intoxicados tratados (FETTIPLACE et al., 2013). Em contraposto, no presente estudo a ausência de alterações dentro dos grupos ELI e R demonstra que estas infusões não interferiram na PAS, PAD e PAM de coelhos. A ausência de diferença significativa no grupo DZxELI entre T0 e T2 demonstra que mesmo em associação ao DZ a ELI também não altera a pressão arterial sanguínea. Estes resultados, juntamente com os resultados relativos à temperatura, sugerem que nas condições propostas a ELI não apresenta efeito inotrópico positivo e vasoconstritivo, e este mecanismo pode não ser um dos responsáveis pelo benefício gerado pelas ELI em intoxicações, ao contrário do relatado por FETTIPLACE et al. (2013).

É possível que a diferença entre os resultados obtidos no presente experimento e estudos prévios que demonstraram alteração na pressão sanguínea após administração da ELI seja devido à diferença na composição da ELI, nas doses administradas, na taxa da infusão, presença de alterações clínicas concomitantes ou devido às características inerentes às espécies diferentes envolvidas. Suínos, por exemplo, são considerados modelos inadequados para estudos envolvendo a ELI (BEDOCS et al., 2014). Muitos estudos realizados fora do Brasil utilizam o Intralipid® 20%, o qual é formulado com emulsão de LCT e composição de 50% ácidos graxos poli-insaturados, 26% monoinsaturados e 19% saturados (GOSMANOV et al., 2012). No presente estudo, foi utilizada ELI (Lipovenos® MCT) que apresenta em sua formulação não somente LCT (óleo de soja), mas também MCT (LIPOVENOS, 2016). Outro fator que deve ser destacado é o fato de os animais estarem anestesiados em vários estudos, o que não condiz com a realidade clínica, ao contrário do realizado neste experimento, podendo afetar os dados obtidos.

Hipotensão e taquicardia foram observadas em indivíduos hipersensíveis à soja que receberam ELI (WEIDMANN et al., 1997). Desta forma, a ausência de alterações da pressão arterial e FC nos grupos medicados com ELI sugerem que no atual experimento os animais não apresentaram reação de hipersensibilidade a estas emulsões.

2.3.3 HEMOGASOMETRIA

A avaliação da hemogasometria tem como principal objetivo identificar distúrbios ácido-base e eletrolíticos. Vale ressaltar que as desordens ácido-base em coelhos são complexas, e os seus mecanismos ainda não são completamente compreendidos (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013). Neste experimento foram avaliados o pH, pCO₂, HCO₃⁻, pressão parcial de oxigênio (pO₂), saturação de oxigênio (sO₂), excesso de base do líquido extracelular (BE_{efc}), ânion Gap (AnGap), lactato, potássio (K⁺), sódio (Na⁺), cálcio ionizado (iCa⁺) e cloro (Cl⁻). Os valores de referência para coelhos estão descritos no Quadro 2.5.

Para a avaliação inicial do equilíbrio ácido-base dos animais, utiliza-se os parâmetros pH, pCO₂ e HCO₃⁻. O pH é uma expressão da concentração do íon hidrogênio (H⁺) (DAY, 2002). Em coelhos, um pH igual a 7,4 se refere ao valor de eudremia (pH neutro), e este deve ser utilizado como um ponto de referência para a avaliação deste parâmetro (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013). Vários processos fisiológicos são otimizados neste pH, ou próximo deste valor, e alterações podem interferir em funções enzimáticas celulares (BATEMAN, 2008).

Quadro 2.5 - Intervalo de referência do pH, pCO₂, HCO₃⁻, pO₂, sO₂, BE_{efc}, AnGap, lactato, K⁺, Na⁺, iCa⁺ e Cl⁻ em coelhos.

Parâmetro	Intervalo de referência
pH	7,35 – 7,54 ^{a,b}
pCO ₂ (mmHg)	25,50 – 52,90 ^{a,b,c}
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	17,50 – 29,40 ^{a,b}
pO ₂ (mmHg)	50,30 – 102,00 ^{a,c,d}
sO ₂ (%)	93,00 – 98,00 ^{a,b,c}
BE _{efc}	-7 – 5 ^b
AnGap (mmol/L)	11 – 26 ^b
Lactato (mmol/L)	0,90 – 21,20 ^e
K ⁺ (mmol/L)	3,28 – 5,56 ^{a,b,f}
Na ⁺ (mmol/L)	125 – 150 ^{a,d,f,g}
iCa ⁺ (mmol/L)	1,64 – 1,94 ^{a,b}
Cl ⁻ (mmol/L)	92 – 120 ^{d,g}

Fontes: ^a EATWELL et al., (2013); ^b ARDIACA, BONVEHÍ e MOSTESINOS (2013); ^c BARZAGO et al., (1992); ^d SUCKOW e SCHROEDER (2012); ^e HUPFELD (2009); ^f OZKAN, KAYA e AKGUL (2012); ^g HEIN e HARTMANN (2003).

Em T0, todos os animais apresentaram valores de pH considerados normais para a espécie, sem diferença estatística entre os grupos. Porém, em T5 foi observada queda do pH nos grupos DZxELI e ELI, que apresentaram valores significativamente menores do que os

demais grupos, e abaixo da considerado normal para coelhos (Tabela 2.9 e Quadro 2.5). Os valores mínimos encontrados nos grupos DZxELI e ELI foram iguais a 7,11 e 7,18, respectivamente. Complicações cardiovasculares com risco à vida podem ocorrer em animais com pH abaixo de 7,20 (DAY, 2002). Na rotina prática, considera-se que valores abaixo de 7,20 requerem tratamento além de fluidoterapia, e os menores que 6,8 são considerados incompatíveis com a vida. Uma vez que esta redução foi observada somente nos grupos tratados com ELI, conclui-se que a infusão gordurosa, associada ou não ao DZ, resultou em acidemia nos coelhos.

Tabela 2.9 - Média e desvio padrão do pH em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	7,42±0,05	7,41±0,07	7,41±0,03 _A	7,43±0,03 _A	7,38±0,09
T5	7,44±0,04 _a	7,45±0,07 _a	7,25±0,11 _{Bb}	7,26±0,06 _{Bb}	7,40±0,02 _a

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de pH em coelhos: 7,35 – 7,54 (Fonte: ARDIACA, BONVEHÍ e MOSTESINOS, 2013; EATWELL et al., 2013).

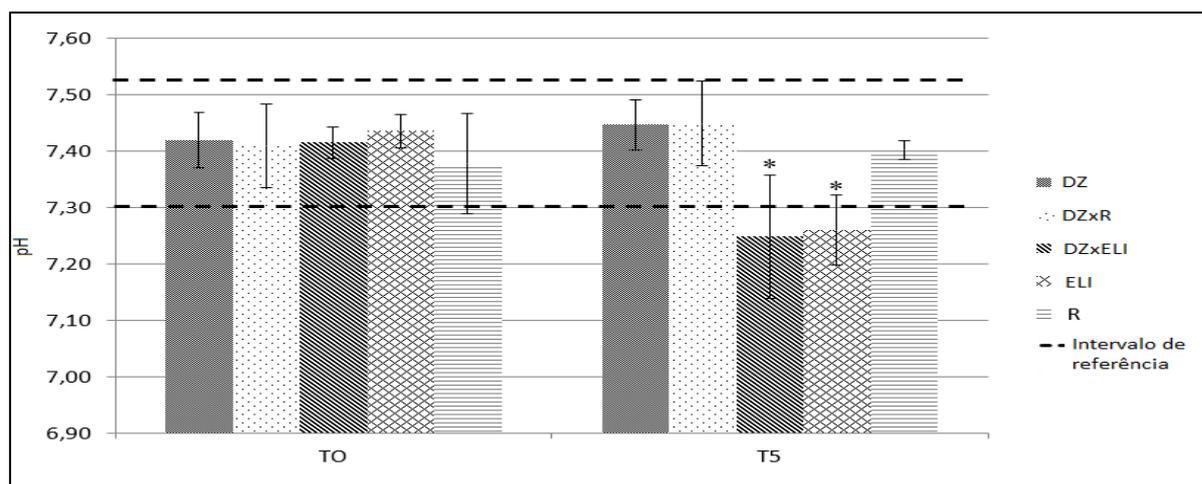


Figura 2.5 - Média e desvio padrão do pH em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R. O intervalo entre as linhas tracejadas se refere ao intervalo de normalidade da espécie.

* Apresentam diferença estatística dos valores obtidos no mesmo grupo em T0 e dos demais grupos em T5, porém iguais entre si.

Para adequada classificação do desequilíbrio ácido-base observado, e entendimento do grau de contribuição de fatores respiratórios e não-respiratórios (metabólicos) na alteração do pH, os valores de $p\text{CO}_2$ e HCO_3^- foram avaliados em seguida.

O HCO_3^- é o principal tampão plasmático, e reflete o componente metabólico do estado ácido-base, enquanto a $p\text{CO}_2$ traz informações sobre a ventilação do indivíduo e o componente respiratório desta condição (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013; BATEMAN, 2008; DAY, 2002).

Em T0, todos os grupos foram estatisticamente iguais, com valores médios dentro do esperado para a espécie (Tabela 2.10 e Quadro 2.5). Após as infusões, houve redução na concentração de HCO_3^- nos grupos DZxELI e ELI, e o DZxELI apresentou valores significativamente menores do que DZ. No grupo ELI a média encontrada foi inferior ao valor de referência para esses animais (Quadro 2.5). Desta forma, pode-se concluir que a infusão de ELI resultou em alterações que reduziram o HCO_3^- plasmático. A redução primária na concentração de HCO_3^- reflete a ocorrência de acidose metabólica. Esta pode ocorrer por aumento na produção de ácidos, como o ácido láctico, por redução na excreção renal de H^+ ou devido à perda excessiva de HCO_3^- , como ocorre em alguns casos de diarreia (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013). Nenhum dos coelhos observados apresentou alterações compatíveis com condições de redução na eliminação de H^+ ou de perda excessiva de HCO_3^- , sugerindo que a ELI gerou aumento da produção de ácidos. No grupo DZxR, a concentração de HCO_3^- aumentou de T0 para T5, porém sem significado clínico, uma vez que neste momento a média não ultrapassou os valores considerados normais para coelhos.

De acordo com a bula da ELI (LIPOVENOS, 2016), acidose metabólica pode ocorrer após a administração de sobredose da emulsão lipídica sem a administração concomitante de carboidratos. Nela, considerou-se em humanos como sobredose o volume infundido que resulta em TG séricos acima de 270mg/dL. Todos os animais do presente estudo tratados com ELI apresentaram TG séricos acima de 2000mg/dL. Desta forma, o volume infundido se encaixa na definição de “sobredose” do fabricante, e a acidose era esperada.

Tabela 2.10 - Média e desvio padrão dos níveis de HCO_3^- (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	21,8±1,8	20,6±6,7 _B	21,9±3,1 _A	23,7±2,4 _A	17,9±3,9
T5	24,7±3,5 _a	24,7±6,9 _{Aab}	18,6±2,5 _{Bbc}	16,7±0,7 _{Bc}	19,2±1,9

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de HCO_3^- em coelhos: 17,50 – 29,40 mmol/L (Fonte: ARDIACA, BONVEHÍ e MOSTESINOS, 2013; EATWELL et al., 2013).

Assim como o HCO_3^- , o BE_{ecf} também é utilizado na avaliação do componente metabólico, determinando a magnitude da contribuição não respiratória ao estado ácido-base. Este parâmetro se refere à quantidade de ácido ou base necessária para titular o líquido intracelular médio para um pH plasmático arterial de 7,4 a uma pCO_2 de 40 mmHg e 37°C. Valores mais baixos de BE_{ecf} sugerem acidose metabólica, enquanto os mais altos refletem alcalose metabólica (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013; BATEMAN, 2008).

Em T0, não houve diferença significativa no BE_{ecf} entre os grupos, porém em T5 os grupos DZxELI e ELI apresentaram médias mais baixas do que as obtidas no seu estado basal (Tabela 2.11 e Figura 2.6). Estes valores foram significativamente menores do que os encontrados nos grupos DZ e DZxR. De forma similar à avaliação do HCO_3^- , conclui-se que a administração da ELI resultou em acidose metabólica (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013).

Tabela 2.11 - Média e desvio padrão do BE_{efc} em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	-1,4±1,9	-2,9±7,4 _B	-1,5±3,1 _A	0,6±2,5 _A	-5,7±4,8
T5	1,5±3,6 _a	1,4±7,1 _{Aa}	-7±2,7 _{Bb}	-8,3±1,1 _{Bb}	-4,1±1,8

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de BE_{efc} em coelhos: -7 a 5 (Fonte: ARDIACA, BONVEHÍ e MOSTESINOS, 2013).

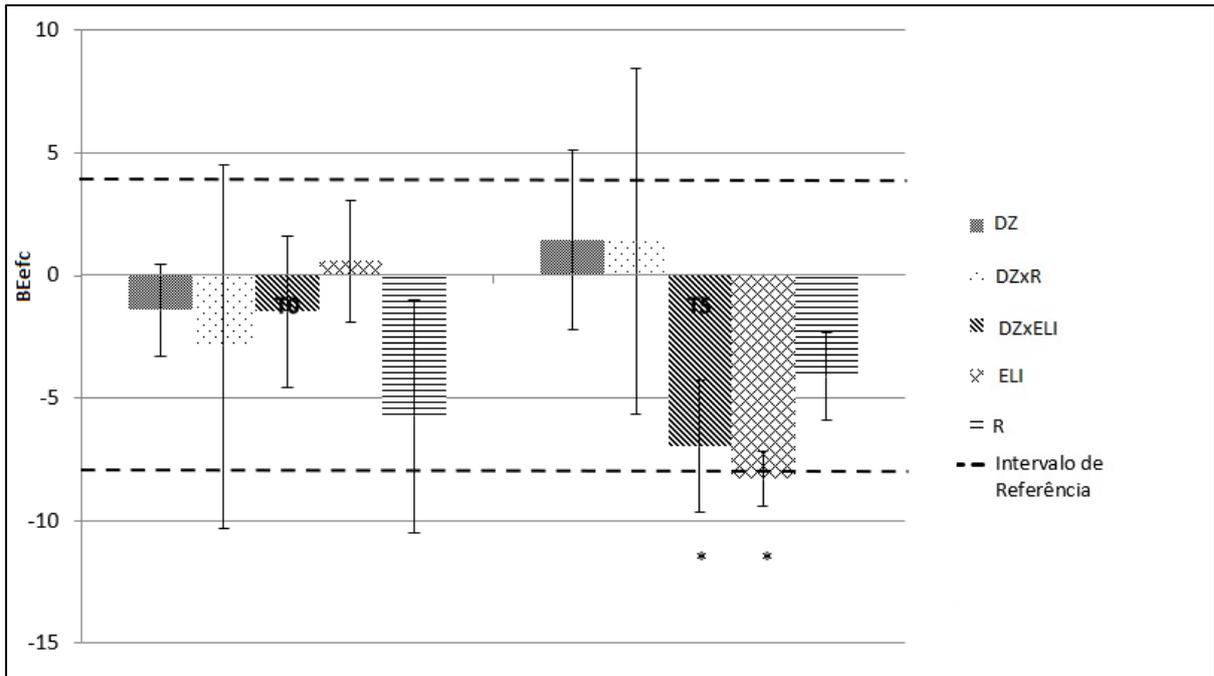


Figura 2.6 - Média e desvio padrão do BE_{efc} em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R. O intervalo entre as linhas tracejadas se refere ao intervalo de normalidade da espécie. *Apresentaram valores estatisticamente mais baixos do que os do mesmo grupo em T0.

No grupo DZxR, foi observado aumento em T5 em relação a T0 do BE_{efc}, sugerindo a ocorrência de alcalose metabólica, compatível com o aumento nos níveis de HCO₃⁻. Este aumento não parece ser clinicamente significativo, uma vez que a média do grupo permaneceu dentro dos limites de referência (Quadro 2.5).

Para a avaliação do componente respiratório no estado ácido-básico utiliza-se a pCO₂. O dióxido de carbono (CO₂) é produzido pelo metabolismo celular e eliminado com a expiração respiratória. Em estados de hipoventilação este ácido volátil é acumulado, aumentando a pCO₂ (hipercapnia) com conseqüente redução do pH, enquanto na hiperventilação a pCO₂ diminui (hipocapnia), e o pH aumenta (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013; DAY, 2002).

Em T0, todos os animais apresentavam valores de pCO₂ dentro da normalidade (Tabela 2.12 e Quadro 2.5), sem diferença entre os grupos. Em T5, foi observado aumento significativo somente no grupo DZxELI (Tabela 2.12 e Figura 2.7), com diferença estatística do grupo R. Uma vez que esta alteração não foi observada nos grupos DZ e ELI, sugere-se que apesar da ELI e do DZ não causarem alteração na pCO₂ individualmente, quando associados resultam em aumento neste parâmetro.

Tabela 2.12 - Média e desvio padrão da pCO₂ (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	35,9±4,7	33,9±6,7	36±4,9 _B	37,2±4,2	31,8±1,8
T5	37,2±2,6	36,2±1,8	47,6±16,9 _{Aa}	41,2±6,2	32,9±3,9 _b

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de pCO₂ em coelhos: 25,50 – 52,90 mmHg (Fonte: BARZAGO et al., 1992; ARDIACA, BONVEHÍ e MOSTESINOS, 2013; EATWELL et al., 2013).

Apesar de a média geral do grupo DZxELI estar dentro do intervalo de referência (Quadro 2.5), dois animais apresentaram em T5 valores de pCO₂ (77,60 e 56,70) acima destes limites, demonstrando a presença de um componente respiratório. Em ambos, o pH era menor que 7,20. Assim, estes animais apresentavam acidose respiratória. É interessante ressaltar que durante a avaliação clínica (ausculta torácica) e histopatológica pulmonar destes indivíduos (discutida com mais profundidade em item específico), não foi observada alteração significativa que justificasse a mudança na concentração de CO₂.

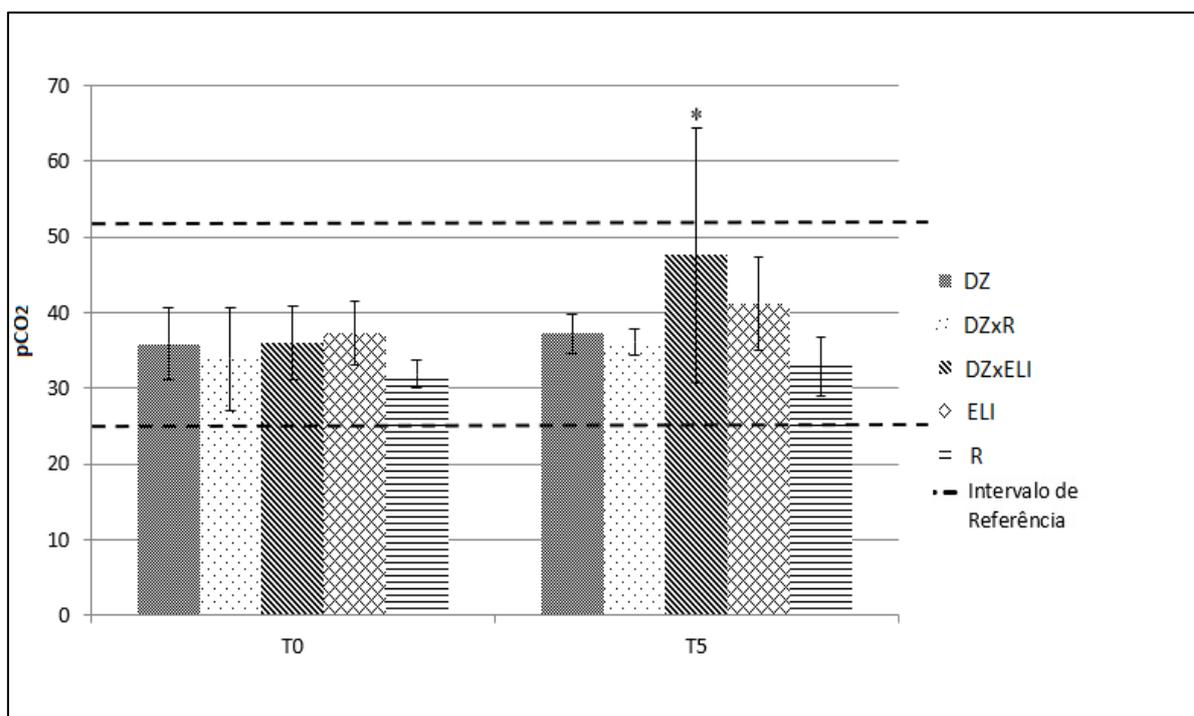


Figura 2.7 - Média e desvio padrão da pCO₂ (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R. O intervalo entre as linhas tracejadas se refere ao intervalo de normalidade da espécie. * Apresenta diferença estatística dos valores obtidos no mesmo grupo em T0.

Uma vez que a avaliação da condição do sistema pulmonar é realizada não somente com a $p\text{CO}_2$, mas também com a $p\text{O}_2$ e a $s\text{O}_2$, estas últimas foram utilizadas para maior avaliação do efeito do DZ e da ELI no sistema respiratório. A $p\text{O}_2$ se refere ao estado de oxigenação do organismo, enquanto a $s\text{O}_2$ indica a quantidade de oxigênio que se liga à hemoglobina (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013; DAY, 2002). Em nenhum momento foi observada diferença significativa da $p\text{O}_2$ e da $s\text{O}_2$ entre os grupos e dentro dos grupos nos diferentes tempos (Tabela 2.13).

Tabela 2.13 - Média e desvio padrão da $p\text{O}_2$ (mmHg) e $s\text{O}_2$ (mmHg) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0 - $p\text{O}_2$	98,1±8,7	107±8,3	104,3±17,5	101,9±6,7	105,4±7,3
T5 - $p\text{O}_2$	97,9±8,5	97,9±11,9	105,1±12	111,5±4,0	104,3±7,9
T0 - $s\text{O}_2$	96,8±2,4	97,5±0,4	96,6±2,9	96,5±3	97,6±2,4
T5 - $s\text{O}_2$	97,8±1,6	98,0±1,5	95,9±2,9	96,2±2,6	98,0±1

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência da $p\text{O}_2$ em coelhos: 50,30 – 102,00 mmHg (Fonte: BARZAGO et al., 1992; SUCKOW e SCHROEDER, 2012; EATWELL et al., 2013).

(3) Intervalo de referência da $s\text{O}_2$ em coelhos: 93,00 – 98,00 % (Fonte: (BARZAGO et al., 1992; ARDIACA, BONVEHÍ e MOSTESINOS, 2013; EATWELL et al., 2013).

A razão $p\text{O}_2/\text{FiO}_2$ também foi utilizada para avaliar a efetividade do fornecimento de oxigênio pelos pulmões para a corrente sanguínea (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013), a qual pode ser utilizada para a avaliação de ocorrência de SARA (DAY, 2002), sugerida como um dos possíveis efeitos colaterais da utilização de altas doses de ELI (LEVINE et al., 2014). Valores acima de 400 demonstram função pulmonar normal, abaixo de 300 sugerem lesão pulmonar aguda, enquanto os menores que 200 indicam disfunção pulmonar grave e são um critério para o diagnóstico de SARA. Quando o animal está respirando o ar ambiental sem suplementação de oxigênio, a FiO_2 (fração de oxigênio inspirado) é igual a 0,21 (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013; BATEMAN, 2008; DAY, 2002). A menor $p\text{O}_2$ encontrada nos grupos medicados com ELI foi igual a 92,50. Desta forma, a menor razão $p\text{O}_2/\text{FiO}_2$ encontrada foi igual a 440, o que sugere ausência de disfunção pulmonar grave, como a SARA. Sugere-se então que a causa do aumento na $p\text{CO}_2$ foi extrapulmonar.

Agentes sedativos ou anestésicos podem resultar em redução da ventilação e consequente hipercapnia (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013; DAY, 2002). O DZ geralmente não apresenta grandes efeitos no sistema respiratório, como demonstrado pela ausência de alterações respiratórias no grupo DZ. Porém, acredita-se que no grupo DZxELI a hipoventilação tenha sido mais evidenciada em alguns animais devido à condição concomitante de acidose metabólica pela administração de ELI, a qual não permitiu que alterações discretas fossem compensadas. Apesar dos dois animais que estavam com $p\text{CO}_2$ acima dos valores normais no grupo DZxELI apresentarem exame neurológico normal em T5, é possível que os efeitos da sedação no desequilíbrio ácido-básico ainda não tivessem sido completamente corrigidos.

Ao associarmos os resultados da avaliação dos níveis de HCO_3^- e a $p\text{CO}_2$ no grupo DZxELI que evoluíram em sentidos opostos (um reduziu enquanto o outro aumentou), concluiu-se que houve acidose mista, com componentes tanto metabólicos (devido à administração da ELI) quanto respiratórios (possivelmente por hipoventilação secundária à sedação) (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013; DAY, 2002).

Por outro lado, a redução do pH observada no grupo ELI não apresentou interferência respiratória, uma vez que não houve alteração na $p\text{CO}_2$ neste grupo. Nele, todos os animais permaneceram com este parâmetro dentro dos valores de normalidade para coelhos.

Para melhor avaliação da causa da acidose metabólica gerada pela administração da ELI, avaliou-se o AnGap. Ele é a medida da diferença entre os cátions e ânions presentes no plasma, fornecendo informação adicional à classificação do tipo de desordem ácido-base. O seu cálculo é realizado de acordo com a fórmula:

$$\text{AnGap} = (\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-).$$

Este cálculo não leva em conta alguns íons, como sulfatos, fosfatos, cálcio, lactato, cetoácidos e proteínas. Aumento significativo no valor médio de AnGap foi observado no grupo DZxELI (Tabela 2.14). Este aumento geralmente está associado ao aumento de ácidos inorgânicos e redução de HCO_3^- (este último já havia sido observado neste grupo) (ARDIACA; BONVEHÍ; MOSTESINOS, 2013; DAY, 2002).

Tabela 2.14 - Média e desvio padrão do AnGap (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	10,9±2,0	13,3±5,7 _a	8,9±3,3 _{Aa}	3,3±13,1 _b	14,6±5,9 _a
T5	10,7±2,9	4,8±16,2	14,4±2,7 _B	10,3±12,0	11,9±2,4

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência do AnGap em coelhos: 11 – 26 mmol/L (Fonte: ARDIACA, BONVEHÍ e MOSTESINOS, 2013).

Lactato sérico foi mensurado, e na sua avaliação inicial (T0) foi possível observar diferença estatística entre os grupos DZxELI e R (Tabela 2.15 e Figura 2.8). Este resultado demonstra a ampla variação individual deste parâmetro em coelhos, com valores médios maiores do que em outras espécies. Durante a avaliação de 65 coelhos saudáveis, HUPFELD (2009) encontrou concentrações que variaram de 0,9 a 21,2 mmol/L (média=7,5mmol/L). No presente estudo, em T0, o valor mínimo encontrado foi 1,1 mmol/L e o máximo foi 16,0 mmol/L. LANGLOIS et al. (2014) observou em coelhos concentração média de 7,1 mmol/L.

Tabela 2.15 - Média e desvio padrão dos níveis de lactato (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	4,15±2,16	6,53±4,22	2,67±1,36 _b	4,45±2,10	7,27±5,08 _{Aa}
T5	5,25±2,72	4,92±1,98	4,70±1,84	5,68±2,08	3,53±1,09 _B

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de lactato sanguíneo em coelhos: 0,9 – 21,20 mmol/L (Fonte: HUPFELD, 2009).

A concentração sérica de lactato reduziu em R após a administração do ringer lactato, e não foi alterada nos outros grupos. A infusão de ringer lactato, pela expansão no volume circulatório, pode ter melhorado a perfusão tecidual, com conseqüente redução do lactato. É importante ressaltar, porém, que em todos os grupos os valores permaneceram dentro do intervalo considerado normal para coelhos (Quadro 2.5). Uma vez que não foi observado aumento nos níveis de lactato nos grupos DZxELI e ELI, a acidose metabólica causada pela ELI não foi devido à acidose láctica.

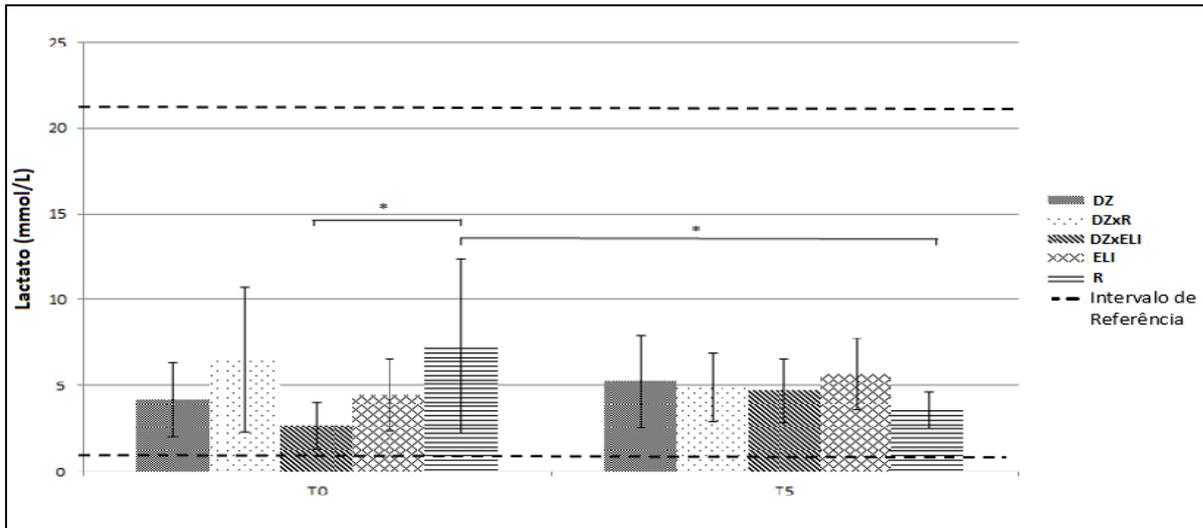


Figura 2.8 - Média e desvio padrão da concentração de lactato (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R. O intervalo entre as linhas tracejadas se refere ao intervalo previamente descrito por HUPFELD (2008) em coelhos saudáveis. *Diferença estatística entre os grupos.

Assim como observado com Delta-T, a ausência de diferença significativa nos níveis de lactato nos grupos que receberam ELI também sugere ausência de vasoconstrição. Os níveis de lactato podem ser utilizados como marcadores de alterações na perfusão tecidual, uma vez que o comprometimento da perfusão periférica desencadeia anaerobiose e gera mais lactato (MORAIS, 2016).

Os eletrólitos K, iCa, Na e Cl também foram avaliados. Durante a avaliação inicial da concentração de K⁺, todos os grupos foram iguais entre si. Com exceção do grupo R, em T5 a concentração média de K⁺ diminuiu em todos os grupos. Os grupos DZ, DZxR e DZxELI estavam abaixo da concentração normal, enquanto o ELI estava no limite inferior do valor de referência (Tabela 2.16 e Figura 2.9). Em T5, o valor médio de R foi significativamente maior do que os dos grupos DZxELI e DZxR.

Tabela 2.16 - Média e desvio padrão da concentração sanguínea de K⁺ (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	3,6±0,24 _A	3,82±0,21 _A	3,65±0,08 _A	3,8±0,36 _A	3,6±0,32
T5	3,15±0,36 _B	2,97±0,22 _{Bb}	2,87±0,31 _{Bb}	3,32±0,29 _B	3,52±0,22 _a

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de K⁺ sanguíneo: 3,28 – 5,56 mmol/L (Fonte: OZKAN, KAYA e AKGUL, 2012; ARDIACA, BONVEHÍ e MOSTESINOS, 2013; EATWELL et al., 2013).

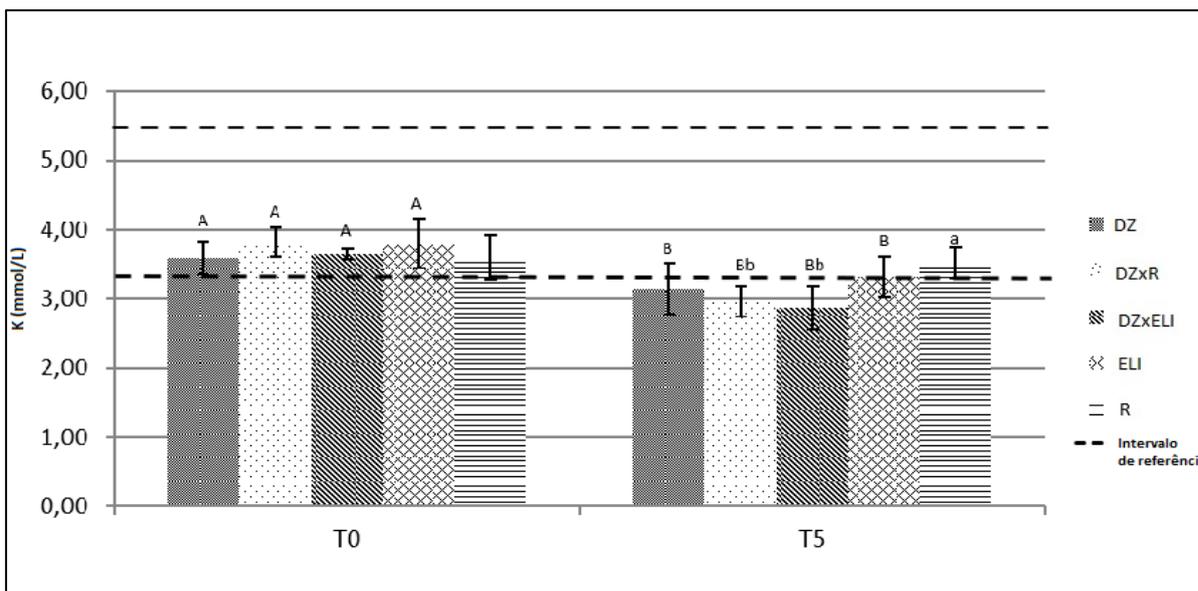


Figura 2.9 - Média e desvio padrão da concentração de K (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R. O intervalo entre as linhas tracejadas se refere ao intervalo de normalidade da espécie. * Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre grupos em um mesmo momento. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre tempos diferentes em um mesmo grupo.

Não foram observadas alterações ou diferenças significativas entre os grupos nos níveis de iCa , Cl^- e Na^+ (Tabela 2.17), demonstrando ausência de interferência dos tratamentos administrados nestes parâmetros. As concentrações séricas de Cl^- e Na^+ encontradas estavam dentro dos valores de referência para coelhos, porém os valores de iCa eram mais baixos do que o descrito na literatura. EATWELL et al. (2013) relataram um intervalo de 1,64 a 1,94 mmol/L, enquanto ARDIACA, BONVEHÍ, MOSTESINOS e (2013) sugeriram um intervalo de 1,67 a 1,85 mmol/L. Entretanto, os coelhos deste experimento apresentaram valores basais que variaram de 1,32 a 1,69 mmol/L, sem manifestação clínica ou condição predisponente que justificasse uma hipocalcemia. Desta forma, sugere-se que este grupo de animais apresenta em condições normais iCa em concentrações mais baixas do que o relatado previamente para coelhos.

Tabela 2.17 - Média e desvio padrão das concentrações sanguíneas de iCa (mmol/L), Cl⁻ (mmol/L) e Na⁺ (mmol/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0 – Cl	107,67±4,27	106±4,56	108,17±5,31	110,67±7,26	110,33±5,28
T5 – Cl	105,17±3,65	109±4,19	110±4,38	112,67±7,12	112±4,82
T0 – Ca	1,53±0,03	1,56±0,08	1,58±0,06	1,56±0,13	1,55±0,07
T5 – Ca	1,53±0,05	1,48±0,13	1,49±0,08	1,44±0,16	1,54±0,09
T0 – Na	136,67±4,03	135,33±2,58	135,17±4,21	133,83±6,34	139,33±3,61
T5 – Na	137,33±2,80	135,83±7,57	139,83±2,79	136,33±5,24	139,33±4,13

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de Cl⁻ sanguíneo em coelhos: 92,00 – 120,00 mmol/L (Fonte: HEIN e HARTMANN, 2003; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

(3) Intervalo de referência de iCa sanguíneo em coelhos: 1,64 – 1,94 mmol/L (Fonte: ARDIACA, BONVEHÍ e MOSTESINOS, 2013; EATWELL et al., 2013).

(4) Intervalo de referência de Na⁺ sanguíneo em coelhos: 125,00 – 150,00 mmol/L (Fonte: HEIN e HARTMANN, 2003; OZKAN, KAYA e AKGUL, 2012; SUCKOW e SCHROEDER, 2012; EATWELL et al., 2013).

2.3.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Análise bioquímica foi realizada na tentativa de melhor avaliar o estado clínico dos animais, além de identificar possíveis alterações orgânicas, como lesão hepática ou pancreática, causadas pelo DZ ou pela ELI. Ela consistiu na mensuração da concentração sérica de PT, albumina, ureia, creatinina, TG, colesterol e glicose, e da atividade das enzimas ALT, AST, FA, GGT e amilase. Os valores de referência destes analitos para coelhos estão expostos no Quadro 2.6.

Quadro 2.6 - Intervalo de referência da PT, albumina, ureia, creatinina, ALT, AST, FA, GGT, TG, colesterol, amilase e glicose em coelhos.

Analito	Intervalo de referência
PT (mg/dL)	5,00 – 7,50 ^a
Albumina (mg/dL)	2,70 – 5,00 ^a
Ureia (mg/dL)	11,00 – 62,00 ^{a,b,c}
Creatinina (mg/dL)	0,50 – 2,50 ^{a,c,d,e}
ALT (UI/L)	27,40 – 80,00 ^{d,e}
AST (UI/L)	20,00 – 130,00 ^{a,e}
FA (UI/L)	0,00 – 397,00 ^c
GGT (UI/L)	0,00 – 31,00 ^{c,f}
TG (mg/dL)	50,00 – 200,00 ^{a,c}
Colesterol (mg/dL)	10,00 – 100,00 ^{a,c,e}
Amilase (UI/L)	200,00 – 500,00 ^{a,d,e}
Glicose (mg/dL)	69,00 – 330,00 ^{a,c,e,f,g}

Fontes: ^a SUCKOW E SCHROEDER (2012); ^b BENSON E PAUL-MURPHY (1999); ^c HEIN E HARTMANN (2003); ^d JENKINS (2008); ^e MELILLO (2007); ^f OZKAN, KAYA E AKGUL (2012); ^g HARCOURT-BROWN e HARCOURT-BROWN (2012).

2.3.4.1 PROTEÍNA TOTAL E ALBUMINA

A mensuração da concentração total de proteínas auxilia na avaliação do estado hídrico dos animais, o que deve ser levado em consideração durante a interpretação de outros exames laboratoriais.

No presente estudo é essencial saber se houve diferença na concentração de albumina entre os grupos, pois o DZ e seus principais metabólitos se ligam à albumina, e alterações nos seus níveis séricos podem causar diferenças na manifestação clínica dos animais. A ligação do DZ à proteína afeta a sua distribuição e seu *clearance*, sendo o último aumentado significativamente com uma maior fração livre disponível (KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976).

Em T0, a concentração de PT e albumina foi estatisticamente igual em todos os grupos (Tabelas 2.18 e 2.19). Os valores médios basais de albumina encontrados foram superiores aos valores de referência para a espécie (Tabela 2.19 e Quadro 2.6). A elevação na concentração de albumina pode ocorrer em casos de desidratação (MELILLO, 2007). Embora todos os animais

apresentassem mucosas com umidade adequada, TPC menor que 2 segundos, e turgor cutâneo adequado, sabe-se que até 5% de desidratação pode não resultar em alterações nestes parâmetros. Por outro lado, animais desidratados geralmente apresentam policitemia relativa (aumento do hematócrito devido à redução do volume plasmático) associada à hiperproteinemia, além de poder ocorrer hipernatremia (PAES; LEME; CARNEIRO, 2009), o que não foi observado no presente estudo (dados apresentados nas tabelas 2.17 e 2.30). Desta forma, considerou-se que na população utilizada os valores de albumina eram normalmente superiores ao descrito na literatura, e não sugeriram alteração.

Tabela 2.18 - Média e desvio padrão dos níveis séricos de PT (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	7,29±0,47	6,87±0,43 _A	7,08±0,76	7,15±0,86	7,58±0,57 _A
T5	6,86±0,76 _a	5,95±0,62 _B	**	**	5,64±0,44 _{Bb}

** Não foi possível realizar a mensuração.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de PT sérica em coelhos: 5,00 - 7,50 mg/dL (Fonte: SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Tabela 2.19 - Média e desvio padrão dos níveis séricos de albumina (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	5,56±0,66 _A	5,42±0,64 _A	5,93±0,36	5,65±0,37	5,11±0,19 _A
T5	4,42±0,68 _B	4,05±0,76 _B	**	**	3,60±0,49 _B

** Não foi possível realizar a mensuração.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de albumina sérica em coelhos: 2,70 – 5,00 mg/dL (Fonte: SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Em T5, não foi possível realizar a avaliação dos grupos DZxELI e ELI, e estes dados serão discutidos no capítulo 3. Por outro lado, nos grupos DZxR e R foi observada redução significativa na concentração de ambos os analitos, o que pode ser justificado pelo efeito de diluição devido a infusão de ringer lactato. Também foi observada redução da albumina no grupo DZ, sugerindo que o DZ resulta em queda nesse parâmetro. É importante ressaltar que,

apesar destas reduções, os valores médios encontrados permaneceram dentro dos intervalos de referência para a espécie, sem importante significado clínico (Quadro 2.6).

2.3.4.2 UREIA E CREATININA

As concentrações plasmáticas ou séricas de ureia e creatinina são frequentemente utilizadas como indicadores da função renal. Os níveis de ureia, principal produto do catabolismo proteico hepático, podem variar em coelhos com a função renal, o consumo proteico, a condição nutricional do indivíduo, a função hepática, a atividade da urease na flora cecal, o estado de hidratação e até com o ciclo circadiano do animal. A creatinina, por outro lado, não sofre influência de tantos fatores. Formada durante o metabolismo da creatina muscular, ela é excretada pela filtração glomerular em taxa constante, sendo mais confiável na avaliação da função renal do que a ureia. Aumento devido à lesão renal na concentração destes analitos ocorre após perda da função de 50 a 75% dos néfrons e em casos de redução do fluxo sanguíneo renal (BENSON; PAUL-MURPHY, 1999; JENKINS, 2008; MELILLO, 2007).

Em T0, os valores médios das concentrações séricas de ureia e creatinina de todos os grupos foram considerados estatisticamente iguais (Tabelas 2.20 e 2.21), e as médias se mantiveram dentro dos limites de referência (Quadro 2.6). Em T5, não foi possível realizar avaliação dos valores de ureia obtidos no grupo DZxELI e dos de creatinina nos grupos DZxELI e ELI, pois a maior parte das amostras apresentou erro durante a análise. Desta forma, o efeito real da ELI sobre os níveis séricos de ureia e creatinina não pode ser avaliado. Estes achados serão discutidos no capítulo 3.

Tabela 2.20 - Média e desvio padrão dos níveis séricos de ureia (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	48±5,75	44,73±7,38	43,72±4,71	43,95±6,86 _B	40,87±4,32
T5	43,84±5,84 _b	43,94±5,85 _b	**	57,11±10,26 _{Aa}	44,69±2,82 _b

** Não foi possível realizar a mensuração.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de ureia sérica em coelhos: 11,00 – 62,00 mg/dL (Fonte: BENSON e PAUL-MURPHY, 1999; HEIN e HARTMANN, 2003; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Tabela 2.21 - Média e desvio padrão dos níveis séricos de creatinina (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	1,57±0,39	1,60±0,23	1,42±0,09	1,46±0,29	1,51±0,15
T5	1,48±0,25	1,47±0,15	**	**	1,55±0,22

** Não foi possível realizar a mensuração.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de creatinina sérica em coelhos: 0,50 – 2,50 mg/dL (Fonte: HEIN e HARTMANN, 2003; MELILLO, 2007; JENKINS, 2008; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

A ausência de alterações nos níveis séricos de ureia e creatinina dos grupos DZ e DZxR sugerem que a administração de DZ não resultou em prejuízo da função renal. GUIGNARD et al. (1975) observaram redução transitória da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal em coelhos após a administração de 4 mg/kg e 7 mg/kg de DZ por via IV, possivelmente devido à queda transitória da pressão sanguínea sistêmica. A divergência entre estes dados e os obtidos no presente estudo se deve possivelmente à diferença da dose administrada e ausência de redução da PAS após a administração de DZ.

2.3.4.3 ALANINA AMINOTRANSFERASE, ASPARTATO AMINOTRANSFERASE, FOSFATASE ALCALINA E GAMA GLUTAMIL TRANSFERASE

Em coelhos, não há um exame enzimático único comercialmente disponível para a avaliação específica da função hepática (BENSON; PAUL-MURPHY, 1999). A associação da análise da atividade de ALT, AST, FA, GGT e da condição clínica do animal podem auxiliar nesta avaliação.

A AST apresenta maior atividade no fígado e na musculatura esquelética nesta espécie, apesar de também ser encontrada no coração, rim e pâncreas. Elevações na sua atividade podem ocorrer devido a danos hepáticos, lesão muscular, estresse durante a coleta ou devido à hemólise (BENSON; PAUL-MURPHY, 1999; JENKINS, 2008; MELILLO, 2007). O fato de a sua atividade ser alterada durante a contenção prejudica o seu valor diagnóstico (MELILLO, 2007). A enzima ALT é um importante indicador da função hepática de cães, gatos, humanos e ratos, porém em coelhos apresenta menor relevância devido à baixa especificidade tecidual. A atividade cardíaca da enzima é similar à hepática em coelhos (JENKINS, 2008). Ao contrário da AST, sua atividade não é alterada pelo estresse da contenção, permitindo desta forma melhor

utilização como um dos indicadores de lesão hepática (MELILLO, 2007). As atividades de ambas apresentam correlação com o grau de necrose hepática (JENKINS, 2008).

As médias das atividades de ALT e AST foram estatisticamente iguais em todos os tempos e grupos (Tabela 2.22 e Tabela 2.23). Estes resultados sugerem que o DZ e a ELI, administrados separadamente ou em conjunto, não alteram a função hepática. Entretanto, é possível que os resultados obtidos nos grupos DZxELI e ELI estejam subestimados pela interferência da lipemia na avaliação destas enzimas, e desta forma devem ser utilizados com cautela. Maiores informações referentes a estes achados serão expostas no capítulo 3.

BRANCO (2015) observou discreto aumento na atividade de ALT e AST após a administração de ELI 20% (LCT) em coelhos. Por outro lado, RUBIN et al. (1992) avaliaram o efeito da administração de diferentes ELI 20% (compostas por LCT, MCT ou uma mistura de MCT e LCT), na dose de 35 mL/kg/dia durante 48 horas, na função hepática e excreção biliar de ratos. Foi observado que a atividade de ALT, AST e FA não foi alterada. É importante ressaltar, porém, que nos grupos que receberam LCT houve infiltração gordurosa hepática. No presente estudo, avaliação histológica hepática foi realizada em todos os coelhos, e será discutida em item específico ao final deste capítulo.

Algumas médias da atividade de ALT encontradas estavam discretamente acima dos limites de referência para coelhos (Tabela 2.23 e Quadro 2.6), inclusive no momento basal. Aumento discreto deste valor pode ser encontrado em coelhos saudáveis (MELILLO, 2007). Desta forma, estes valores foram considerados normais e atribuídos a características da população utilizada.

Tabela 2.22 - Média e desvio padrão da atividade da AST (UI/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	78,15±57,12	74,80±47,69	55,20±32,80	48,88±16,56	71,63±62,57
T5	66,72±22,91	72,12±34,51	67,48±22,04**	69,98±22,15**	61,23±17,05

** Resultados podem estar subestimados.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de AST sérica em coelhos: 20,00 – 130,00 UI/L (Fonte: MELILLO, 2007; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Tabela 2.23 - Média e desvio padrão da atividade da ALT (UI/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	77,32±36,40	81,17±37,94	66,22±44,77	69,17±29,02	83,63±29,14
T5	64,26±24,34	80,27±41,44	80,30±24,86**	72,63±36,35**	86,29±53,13

** Resultados podem estar subestimados.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de ALT sérica em coelhos: 27,40 – 80,00 UI/L (Fonte: MELILLO, 2007; JENKINS, 2008).

A FA é amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada em diferentes tecidos. Sua atividade normal é proveniente não somente do fígado, mas também dos ossos, intestino, rins e placenta. Aumentos podem ser observados em animais saudáveis, como em jovens (BENSON; PAUL-MURPHY, 1999; JENKINS, 2008; MELILLO, 2007). Necrose hepática resulta em elevação mínima na atividade da FA, porém pode ser maior em casos de estase biliar (JENKINS, 2008; MELILLO, 2007).

Não foi observada diferença significativa da atividade da FA entre os grupos em T0 e em T5 (Tabela 2.24), porém assim como na avaliação da AST e ALT é possível que os valores de DZxELI e ELI tenham sido subestimados na segunda análise (resultados discutidos no capítulo 3). A ausência de diferença significativa em T5 entre os grupos DZ e R sugere que o DZ não interferiu significativamente na atividade desta enzima.

Tabela 2.24 - Média e desvio padrão da atividade da FA (UI/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	221,13±143,65 _B	110,73±36,50	169,72±144,03 _B	118,58±24,50 _B	141,10±47,50
T5	152,95±56,41 _A	90,70±23,57	88,07±70,56 _A **	48,96±17,33 _A **	97,24±23,08

** Resultados podem estar subestimados.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de FA sérica em coelhos: 0,00 – 397,00 UI/L (Fonte: HEIN e HARTMANN, 2003).

A enzima GGT está presente no fígado e nos rins de coelhos, com maior concentração no epitélio do túbulo renal. A GGT renal, porém, é eliminada na urina e não é encontrada na circulação sanguínea. A GGT hepática apresenta baixa atividade, e a sua elevação geralmente

está associada à obstrução biliar, mas com menor sensibilidade em comparação a outras espécies (BENSON; PAUL-MURPHY, 1999; MELILLO, 2007). Apesar de ser menos sensível que a AST e a ALT, elevações também podem ocorrer com danos hepatocelulares (BENSON; PAUL-MURPHY, 1999).

Todos os grupos foram iguais em T0, porém em T5 não foi possível realizar avaliação estatística nos grupos DZxELI e ELI, provavelmente devido à interferência da lipemia (dados discutidos no capítulo 3) (Tabela 2.25). A mesma dificuldade foi relatada por BRANCO (2015) em coelhos medicados com ELI (LCT). Nos grupos DZ, DZxR e R não foram observadas alterações. Desta forma, conclui-se que o DZ não alterou a atividade da FA.

Tabela 2.25 - Média e desvio padrão da atividade da GGT (UI/l) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	6,02±3,86	7,24±7,29	5,15±3,83	3,33±1,19	8,73±5,17
T5	8,55±3,12	7,41±5,82	**	**	8,41±3,67

** Não foi possível realizar a mensuração.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de GGT sérico em coelhos: 0,00 – 31,00 UI/L (Fonte: HEIN e HARTMANN, 2003; OZKAN, KAYA e AKGUL, 2012).

2.3.4.4 TRIGLICÉRIDES, COLESTEROL E AMILASE

As emulsões lipídicas são ricas em TG. Segundo FERNANDEZ et al. (2011), é inevitável a ocorrência de hipertrigliceridemia e lipemia após a realização dos protocolos usuais com ELI.

Durante a avaliação basal da concentração sérica de TG e colesterol, todos os grupos eram estatisticamente iguais (Tabela 2.26 e Tabela 2.27). Os grupos DZxELI e ELI apresentaram aumento significativo na concentração sérica de TG, com aumento médio maior que 10 vezes o valor basal. Estes se tornaram estatisticamente diferentes dos demais grupos (DZ, DZxR e R) (Tabela 2.26). Estes resultados estão de acordo com os efeitos esperados pela infusão de ELI. Após a administração de ELI 20% (dois *bolus* de 1,5 mg/kg seguidos de infusão na taxa de 0,25 mg/kg/min durante 30 minutos) em um caso de intoxicação por amitriptilina, a concentração sérica de TG aumentou de 182 mg/dL para 1091 mg/dL 1 hora após o término da

infusão (LEVINE et al., 2012). BRANCO (2015) relatou em coelhos Nova Zelândia que receberam *bolus* de 2 mL/kg de ELI 20% (LCT) e infusão de 0,25 mL/kg/min durante 60 minutos o valor médio da concentração sérica de TG igual a 1736 mg/dL logo após o término da infusão, e 1233 mg/dL após 2 horas.

Tabela 2.26 - Média e desvio padrão dos níveis séricos de TG (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	86,89±36,13	69,29±30,61	170,78±227,95 _B	220,29±203,86 _B	96,29±34,78
T5	100,03±26,65 _b	109,97±30,54 _b	2840,66±198,30 _{Aa}	2956,23±570,42 _{Aa}	80,042±31,21 _b

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de triglicérides séricos em coelhos: 50 – 200 mg/dL (Fonte: HEIN e HARTMANN, 2003; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

A hipertrigliceridemia e lipemia resultantes da infusão de emulsão lipídica tendem a ser transitórias, retornando ao normal após algumas horas. Em um projeto piloto realizado durante o planejamento deste experimento, observou-se visualmente redução significativa da lipemia gerada pela ELI após aproximadamente 4 a 6 horas (Figura 2.10).

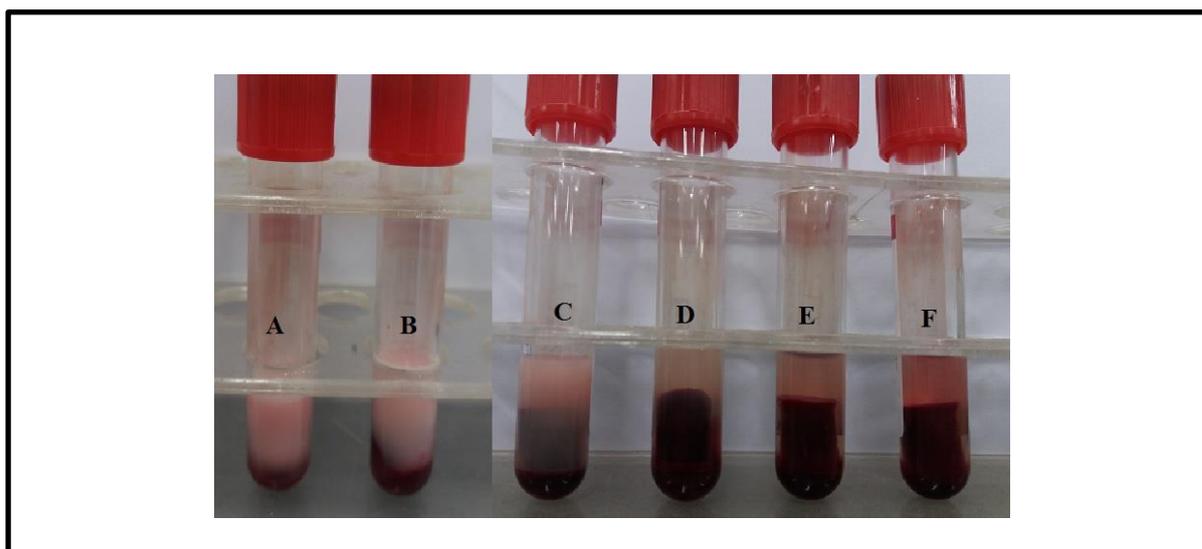


Figura 2.10 - Amostras coletadas de coelho Nova Zelândia e transferidas para tubo sem anticoagulante após a administração de ELI 20% em *bolus* de 1,5 mL/kg seguido de 0,25 mL/kg/min durante 30 minutos. A primeira amostra (A) foi coletada logo após o término da infusão, e as demais (B-F) foram coletadas em intervalos de 2 horas. Em A e B é possível observar intensa lipemia, a qual reduz progressivamente (C-F).

As emulsões lipídicas não contêm colesterol (RUBIN et al., 1992). Porém, correlação entre a administração de ELI e o aumento no nível sérico de colesterol total já foi relatada anteriormente (BARGEN-LOCKNER et al., 1983). A concentração da ELI administrada, a taxa de infusão, a dose administrada e o tempo durante o qual essa infusão é mantida influenciam no acúmulo de lipossomos e, conseqüentemente, de colesterol. A utilização da ELI no tratamento de intoxicações é geralmente realizada com altas doses em tempo curto, predispondo ao acúmulo de lipossomos. O excesso de lipossomos resulta em maior formação da LP-X, a qual é resistente à lipólise, permanecendo estável na circulação. O acúmulo da LP-X resulta em hipercolesterolemia (FERNANDEZ et al., 2011).

Durante a avaliação dos níveis de colesterol, todas as amostras dos grupos DZxELI e ELI apresentaram erro durante a análise pelo analisador bioquímico (Tabela 2.27). Esta alteração será discutida no capítulo 3. Acredita-se que os animais dos grupos tratados com ELI apresentaram elevação na concentração de colesterol, como esperado. BRANCO (2015) relata em coelhos concentração sérica de colesterol média igual a 810 mg/dL logo após a administração de ELI 20%, e igual a 755 mg/dL após 2 horas. A ausência de variação significativa dentro dos grupos DZ e DZxR demonstram que o DZ não interferiu na concentração sérica de TG e colesterol (Tabela 2.26 e Tabela 2.27).

Tabela 2.27 - Média e desvio padrão dos níveis séricos de colesterol (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	24,49±6,07	20,59±10,85	24,69±6,10 _B	31,14±7,14 _B	27,45±6,84
T5	24,58±6,89	17,58±6,42	**	**	24,39±9,92

** Não foi possível realizar a mensuração.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de colesterol sérico em coelhos: 10 – 100 mg/dL (Fonte HEIN e HARTMANN, 2003; MELILLO, 2007; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Em coelhos, o conteúdo de amilase das glândulas salivares, tecido intestinal ou fígado é pequeno. Ela é proveniente primariamente do pâncreas, sendo utilizada clinicamente na detecção de alterações pancreáticas como pancreatite, obstrução do ducto pancreático, peritonite ou trauma abdominal (JENKINS, 2008; MELILLO, 2007). Desta forma, a amilase sérica é utilizada na triagem de pancreatite, e um aumento de duas vezes o valor de referência

é, em geral, sugestivo de pancreatite (HOFFMAN; SOLTER, 2008). Aumento significativo da atividade da amilase foi relatado em todos os coelhos Nova Zelândia submetidos à pancreatite experimental em estudo realizado por GOLDENBERG et al. (2007), sem correlação com a gravidade da pancreatite. Elevação também pode ser observada em casos de lesão renal, devido à redução da filtração glomerular, ou corticoterapia (HOFFMAN; SOLTER, 2008; JENKINS, 2008; MELILLO, 2007).

Em humanos, a pancreatite está entre os principais efeitos colaterais observados após terapia com ELI (HAYES et al., 2016). Sugere-se que a hipertrigliceridemia pode aumentar a ocorrência de pancreatite aguda, além de piorar a progressão do quadro (ANDRADE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016; EDWARDS; SHIHAB; SCOTT, 2014; KISS et al., 2018; PAN et al., 2017). Um estudo retrospectivo humano relatou nove pacientes tratados com ELI após intoxicação e, destes, dois desenvolveram pancreatite (LEVINE et al., 2014). LESKIW e WEINBERG (2009) citaram, por outro lado, a ocorrência de aumento da enzima amilase, porém sem sinais clínicos de pancreatite. HILLER et al. (2010) relataram aumento de mais de 10 vezes da atividade da amilase em ratos após infusão de altas doses de ELI 20%, porém sem qualquer alteração histológica pancreática.

No presente experimento, durante a avaliação da atividade da amilase, todos os grupos foram considerados estatisticamente iguais em T0. Em nenhum dos grupos foi observado aumento significativo da atividade da enzima em T5, porém nos grupos DZxELI, ELI e R houve redução desta atividade (Tabela 2.28). É sugerido que a dose administrada de ELI não resultou em dano pancreático. Esta observação é corroborada pela ausência de alterações histopatológicas e por microscopia eletrônica de transmissão no pâncreas, que serão discutidos ao final deste capítulo. Por outro lado, é possível que os valores obtidos nos grupos medicados com ELI não reflitam a realidade uma vez que, segundo as instruções de uso do reagente (Kovalent[®]), TG acima de 1000 mg/dL podem interferir na avaliação da atividade da amilase. Essa possibilidade será discutida no capítulo 3.

Tabela 2.28 - Média e desvio padrão da atividade de amilase (UI/L) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	388,52±70,40	387,33±60,97	467,14±82,84 _A	437,89±93,00 _A	449,99±151,84 _A
T5	374,94±36,39 _a	364,11±53,46 _a	282,94±72,27 _{B**}	217,61±75,99 _{Bb**}	346,21±71,25 _B

** Resultados podem estar subestimados.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência da amilase sérica em coelhos: 200 – 500 UI/dL (Fonte MELILLO, 2007; JENKINS, 2008; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

2.3.4.5 GLICOSE

A glicose sanguínea pode ser utilizada para avaliar a condição clínica e gravidade de alterações em coelhos. O seu metabolismo é complexo, e pode ser alterado por várias doenças ou eventos fisiológicos (HARCOURT-BROWN; HARCOURT-BROWN, 2012). Situações de estresse resultam frequentemente em aumento na concentração sérica de glicose devido à liberação de catecolaminas (HARCOURT-BROWN; HARCOURT-BROWN, 2012; JENKINS, 2008). Pancreatite aguda também pode causar anormalidades nos níveis de glicose, apesar do pâncreas de coelhos apresentar menor papel no metabolismo de glicose quando comparado à outras espécies (MELILLO, 2007).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos em T0. Em T5, houve aumento da concentração sérica de glicose nos grupos DZ e DZxR, que se tornaram estatisticamente diferentes do grupo R. Estes resultados sugerem que o DZ resulta em aumento deste parâmetro. A ELI, por outro lado, não causou alterações nos níveis sanguíneos de glicose (Tabela 2.29).

Tabela 2.29 - Média e desvio padrão dos níveis séricos de glicose (mg/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	145,34±17,82 _B	133,48±25,64 _B	139,02±16,79	147,75±25,22	130,30±20,83
T5	177,19±40,57 _{Aa}	165,64±23,78 _{Aa}	162,70±22,87 _a	159,07±29,55	113,53±24,55 _b

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de glicose sérica em coelhos: 69,00 – 330,00 mg/dL (Fonte: HEIN e HARTMANN, 2003; MELILLO, 2007; HARCOURT-BROWN e HARCOURT-BROWN, 2012; OZKAN, KAYA e AKGUL, 2012; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Assim como observado, dados prévios sugeriram que o DZ pode resultar em aumento da concentração sanguínea de glicose. SAROV e ILIEVA (2003) relataram aumento da glicose sanguínea em coelhos Nova Zelândia após a administração de 2 mg/kg de DZ por via IM, e sugeriram aumento da resistência à insulina e possível redução da secreção de insulina como mecanismos de ação envolvidos. A ação hiperglicemiante do DZ pode apresentar variação entre diferentes espécies, e maiores estudos são necessários para esta determinação. De qualquer forma, sugere-se cautela durante a utilização de DZ em pacientes diabéticos (SAROV; ILIEVA, 2003). Mesmo com o aumento observado nos grupos DZ e DZxR, todos os valores encontrados estavam dentro do intervalo de referência para coelhos (Quadro 2.6).

2.3.5 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

2.3.5.1 ERITROGRAMA

O eritrograma foi realizado com a determinação do HCT, RBC, HB, HCM, CHCM, VCM e contagem total de plaquetas. O intervalo de referência destes parâmetros está apresentado no Quadro 2.7.

Quadro 2.7 - Intervalo de referência do HCT, RBC, HB, CHCM, HCM, VCM, leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e plaquetas em coelhos.

Parâmetro	Intervalo de referência
HCT (%)	33,00 – 50,00 ^{a,b,c}
RBC ($\times 10^6$ células/ μ L)	5,40 – 8,00 ^{b,c,d}
HB (g/dL)	10,00 – 17,40 ^{b,c,d}
CHCM (g/dL)	30,00 – 35,00 ^{a,b}
HCM (pg)	20,00 – 23,00 ^{a,b}
VCM (fL)	60,00 – 69,00 ^{a,b,c}
Leucócitos Totais ($\times 10^3$ células/ μ L)	5,10 – 9,70 ^a
Linfócitos ($\times 10^3$ células/ μ L)	3,36 – 7,00 ^e
Neutrófilos ($\times 10^3$ células/ μ L)	1,49 – 3,21 ^e
Plaquetas ($\times 10^3$ células/ μ L)	158,00 – 650,00 ^{a,b}

Fontes: ^a SUCKOW e SCHROEDER (2012); ^b JENKINS (2008); ^c HEIN e HARTMANN (2003); ^d BENSON e PAUL-MURPHY (1999); ^e CAMPBELL (2007).

Esta análise foi realizada para a avaliação de possível efeito deletério da ELI nestes constituintes sanguíneos. Hemólise, anemia e trombocitopenia já foram associadas à utilização de altas doses de ELI, ou devido ao uso prolongado (GIBSON et al., 1978; JABEN; KOCH; KARON, 2011; MCGRATH et al., 1982). MCGRATH et al. (1982) sugeriram que o efeito hemolítico se deve à alterações na composição fosfolipídica na membrana das hemácias ou por efeito direto de algum componente da degradação da ELI que atuaria como hemolisina.

2.3.5.1.1 HEMATÓCRITO, CONTAGEM TOTAL DE HEMÁCIAS E CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA

O HCT, a RBC e HB permitem a avaliação da presença ou não de anemia ou policitemia (PAES; LEME; CARNEIRO, 2009).

Em T0, todos os grupos apresentavam valores médios de HCT e RCB estatisticamente iguais. Nos grupos DZxR, ELI e R, houve redução discreta destes parâmetros em T5 (Tabelas 2.30 e 2.31), provavelmente devido ao efeito diluidor das infusões. Estes grupos, porém, mantiveram o HCT e a RBC média dentro dos valores de referência (Quadro 2.7). A ausência de variação no grupo DZ sugere que o DZ não interfere nestes parâmetros.

Uma vez que não houve redução significativa do HCT e da RBC no grupo DZxELI, e pelo fato de não haver diferença significativa em T5 do HCT entre os grupos DZ, DZxR, DZxELI e ELI, e da RBC entre todos os grupos, sugere-se que a ELI não resultou em hemólise.

Tabela 2.30 - Média e desvio padrão do HCT (%) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	42,30±2,21	42,35±2,33 _A	42,40±3,50	44,43±1,67 _A	42,25±3,39 _A
T5	40,88±2,39	39,35±1,96 _B	40,85±3,77	42,58±2,77 _{Ba}	37,35±2,49 _{Bb}

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência do hematócrito em coelhos: 33,00 – 50,00 % (Fonte: HEIN e HARTMANN, 2003; JENKINS, 2008; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Tabela 2.31 - Média e desvio padrão da RBC (células $\times 10^6/\mu\text{L}$) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	6,57 \pm 0,40	6,5 \pm 0,45 _A	6,50 \pm 0,53	6,91 \pm 0,48 _A	6,79 \pm 0,63 _A
T5	6,33 \pm 0,44	6,02 \pm 0,33 _B	6,25 \pm 0,56	6,57 \pm 0,44 _B	6,02 \pm 0,49 _B

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência da contagem de hemácias em coelhos: 5,40 – 8,00 $\times 10^6/\text{mm}^3$ (Fonte: BENSON e PAUL-MURPHY, 1999; HEIN e HARTMANN, 2003; JENKINS, 2008).

Durante a avaliação da concentração de HB, não houve diferença entre os grupos em T0. O aumento observado em T5 somente nos grupos DZxELI e ELI (Tabela 2.32) provavelmente ocorreu devido à lipemia, que pode resultar em valores superestimados da HB, uma vez que a determinação deste parâmetro é realizada por fotometria (PAES; LEME; CARNEIRO, 2009). Estes dados serão mais discutidos no capítulo 3.

Tabela 2.32 - Média e desvio padrão da concentração de HB (g/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	13,73 \pm 0,89	14,00 \pm 0,78 _A	13,8 \pm 1,42 _B	14,63 \pm 0,41 _B	13,93 \pm 1,30 _A
T5	13,30 \pm 0,74 _b	12,83 \pm 0,88 _{Bb}	17,30 \pm 2,26 _{Aa} **	17,78 \pm 0,76 _{Aa} **	12,16 \pm 0,95 _{Bb}

** Valores provavelmente superestimados.

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência da concentração de hemoglobina em coelhos: 10,00 - 17,40 g/dL (Fonte: BENSON e PAUL-MURPHY, 1999; HEIN e HARTMANN, 2003; JENKINS, 2008).

Nenhuma alteração foi observada no grupo DZ, enquanto nos grupos DZxR e R houve discreta redução da HB, possivelmente devido ao efeito diluidor da infusão de ringer por lactato. Apesar desta redução, os valores médios permaneceram dentro dos limites normais (Quadro 2.7).

2.3.5.1.2 CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA, HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA E VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO

A CHCM, a HCM e o VCM fazem parte dos índices eritrocitários do eritrograma, e são usados para a definição dos tipos de anemia (PAES; LEME; CARNEIRO, 2009).

Todos os grupos foram considerados iguais na avaliação basal em relação à HCM, CHCM e VCM. Uma vez que os parâmetros HCM e CHCM são determinados a partir da concentração de HB (PAES; LEME; CARNEIRO, 2009), em T5 os grupos DZxELI e ELI também apresentaram valores provavelmente superestimados após a infusão da ELI (Tabela 2.33), sendo maiores do que o limite de referência considerado normal (Quadro 2.7).

Nenhuma alteração foi observada no VCM entre os diferentes grupos e nos diferentes tempos (Tabela 2.34). Todas as médias encontradas estavam de acordo com o esperado para a espécie (Quadro 2.7).

Tabela 2.33 - Média e desvio padrão do HCM (pg) e CHCM (g/dL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
HCM – T0	20,94±1,38	21,55±0,45	21,22±0,98 _B	21,23±1,14 _B	20,52±0,94
HCM – T5	21,04±1,04 _b	21,27±0,56 _b	27,63±2,25 _{Aa}	27,15±1,99 _{Aa}	20,23±1,21 _b
CHCM – T0	32,46±0,85	33,05±0,50	32,52±1,30 _B	32,93±0,64 _B	32,97±0,44
CHCM – T5	32,54±0,70 _b	32,70±1,40 _b	42,28±3,07 _{Aa}	41,83±2,18 _{Aa}	32,55±0,86 _b

Notas:

- (1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.
- (2) Intervalo de referência da HCM em coelhos: 20,00 – 23,00 pg (Fonte: JENKINS, 2008; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).
- (3) Intervalo de referência da CHCM em coelhos: 30,00 – 35,00 g/dL (Fonte: JENKINS, 2008; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Tabela 2.34 - Média e desvio padrão do VCM (fL) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	64,47±3,15	65,22±1,15	65,23±1,99	64,42±2,27	62,32±3,01
T5	64,65±3,00	65,40±1,15	65,33±1,25	64,83±2,39	62,08±3,05

Notas:

- (1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.
- (2) Intervalo de referência do VCM em coelhos: 60,00 – 69,00 fL (Fonte: HEIN e HARTMANN, 2003; JENKINS, 2008; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

2.3.5.2 LEUCOGRAMA

Os linfócitos são os principais leucócitos encontrados em coelhos, representando 30 a 80% dos leucócitos totais. Os neutrófilos são o segundo tipo leucocitário mais frequente em coelhos, e podem corresponder a 20 a 75% dos leucócitos (JENKINS, 2008). Os valores de referência destes leucócitos em coelhos estão no Quadro 2.7.

Em T0, todos os grupos apresentavam contagem total de leucócitos similar, porém em T5 houve intensa redução nos grupos DZxELI e ELI, que se tornaram estatisticamente diferentes dos demais (Tabela 2.35). Estes resultados sugerem que a ELI gerou intensa leucopenia. Acredita-se, porém, que esta redução seja somente transitória, sem danos à produção leucocitária. BRANCO (2015) observou queda significativa na contagem de leucócitos logo após a infusão de ELI 20% (LCT) em coelhos, e 2 horas após o término da infusão os valores voltaram a ser similares ao encontrado antes do início da administração da emulsão gordurosa.

Tabela 2.35 - Média e desvio padrão dos leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	8,83 \pm 2,87	7,55 \pm 1,41	7,92 \pm 0,61 _A	7,56 \pm 1,39 _A	7,43 \pm 1,84
T5	8,73 \pm 1,65 _a	7,50 \pm 1,70 _a	3,92 \pm 0,99 _{Bb}	3,93 \pm 0,90 _{Bb}	8,05 \pm 2,41 _a

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de leucócitos totais em coelhos: 5,10 – 9,70 $\times 10^3/\mu\text{L}$ (Fonte: SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

HAYES et al. (2016) sugeriram que a redução na contagem total de neutrófilos e linfócitos após administração da emulsão gordurosa pode ter influência de um efeito diluidor, porém a ausência de redução significativa nos grupos DZxR e R sugerem que este não é um fator significativo. A literatura apresenta dados divergentes em relação ao efeito da ELI nos leucócitos.

LIANG, YANG e HO (2012) relataram a ocorrência de leucopenia intensa ($1,5 \times 10^3$ células/ μL) em um homem de 34 anos após receber ELI 10% (12,20 mL/kg/dia) durante dois dias, porém, apesar de pouco provável, existe a possibilidade desta alteração ter sido decorrente do estado prévio do paciente. CURY-BOAVENTURA et al. (2006) observaram em homens

adultos, após infusão única de 500 mL de ELI 20% (Intralipid®) durante 6 horas (83,3 mL/h), indução de morte celular (apoptose e necrose) de linfócitos e neutrófilos devido à despolarização da membrana mitocondrial e acúmulo intracelular de lipídio.

Durante a avaliação diferencial dos leucócitos dos coelhos, foi observada redução do número total de linfócitos em T5 nos grupos DZxELI e ELI (Tabela 2.36). Por outro lado, apesar de poder ser observada redução na contagem de neutrófilos nestes grupos, e contagem total menor nos grupos tratados com ELI em relação aos demais, ela não foi considerada estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 2.37). Estes achados corroboram as observações de CURY-BOAVENTURA et al. (2006) de que a ELI apresentou menor efeito tóxico para os neutrófilos em comparação aos linfócitos. Nos demais grupos (DZ, DZxR e R) foi possível observar aumento dos neutrófilos (Tabela 2.37), sendo significativo nos grupos DZxR e R. Esta variação pode estar associada ao estresse da manipulação (CAMPBELL, 2007).

Tabela 2.36 - Média e desvio padrão da contagem de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	4,39 \pm 1,71	4,54 \pm 1,71	4,04 \pm 1,53 _A	4,21 \pm 1,96 _A	4,13 \pm 1,72
T5	3,50 \pm 1,38	2,80 \pm 1,61	1,62 \pm 1,05 _B	2,22 \pm 0,52 _B	2,69 \pm 0,96

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de linfócitos em coelhos: 3,36 – 7,00 $\times 10^3/\mu\text{L}$ (Fonte: CAMPBELL, 2007).

Tabela 2.37 - Média e desvio padrão da contagem de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	3,91 \pm 1,49	2,73 \pm 1,40 _B	3,41 \pm 1,05	2,83 \pm 1,17	2,88 \pm 0,90 _B
T5	5,03 \pm 2,01 _a	4,54 \pm 1,95 _{Aab}	2,14 \pm 1,67 _{bc}	1,57 \pm 1,02 _c	5,16 \pm 2,01 _{Aa}

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de neutrófilos em coelhos: 1,49 – 3,21 $\times 10^3/\mu\text{L}$ (Fonte: CAMPBELL, 2007).

O efeito imunossupressor das ELI ganha maior importância ao ser administrado geralmente a pacientes críticos, potencialmente aumentando o risco de infecções (CURY-BOAVENTURA et al., 2006), e deve ser levado em consideração durante a decisão da utilização desta terapia em intoxicações.

2.3.5.3 AVALIAÇÃO DAS PLAQUETAS

Os valores normais de plaquetas em coelhos estão no Quadro 2.7.

Em T0, todos os grupos foram considerados estatisticamente iguais em relação à contagem de plaquetas. Somente o grupo R apresentou alteração em T5, com valores estatisticamente menores do que os obtidos em T0 (Tabela 2.38). Entretanto, foi observada maior presença de agregados plaquetários neste grupo, justificando a subestimação dos valores obtidos em T5.

Tabela 2.38 - Média e desvio padrão da contagem total de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em T0 e T5 nos grupos DZ, DZxR, DZxELI, ELI e R.

	DZ	DZxR	DZxELI	ELI	R
T0	261,14 \pm 60,27	266,83 \pm 47,59	255,5 \pm 65,75	356,17 \pm 121,52	369,33 \pm 117,96 _A
T5	280,85 \pm 81,41	276,17 \pm 55,22	257,17 \pm 91,35	295,83 \pm 120,38	251,67 \pm 95,47 _B

Notas:

(1) Avaliação estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes em uma mesma linha referem a valores estatisticamente diferentes.

(2) Intervalo de referência de plaquetas em coelhos: 158,00 – 650,00 $\times 10^3/\mu\text{L}$ (Fonte: JENKINS, 2008; SUCKOW e SCHROEDER, 2012).

Trombocitopenia e alterações plaquetárias foram relatadas como possíveis efeitos colaterais da utilização da ELI a base de soja em alimentações parenterais a longo prazo (LIPSON; PRITCHARD; THOMAS, 1974). LIANG, YANG e HO (2012) relataram a ocorrência de trombocitopenia grave após a utilização de ELI 10% durante dois dias. Apesar dos autores terem associado esta alteração com a infusão, vale ressaltar que o paciente já apresentava trombocitopenia antes desta terapia. STEHBENS (1967) comparou o efeito imediato de três ELI (duas a base de óleo de semente de algodão a 15% e uma de óleo de soja a 20%) no comportamento das plaquetas. As emulsões de óleo de semente de algodão resultaram em redução no número de plaquetas, agregação plaquetária com deformação conformacional, e formação de pequenos trombos plaqueta-leucócitos, enquanto a emulsão de óleo de soja resultou em alterações mais discretas.

Por outro lado, PANTER-BRICK, WAGGET e DALE (1975) citaram o uso de ELI 20% na alimentação parenteral de mais de 50 recém-nascidos, e em nenhum dos casos houve trombocitopenia. Estes autores reforçam outras possíveis causas de trombocitopenia nestas condições, como infecções bacterianas ou transfusões sanguíneas. BEAULIEU et al. (2016) avaliaram o efeito em humanos saudáveis da infusão de ELI (Intralipid® 20%, 45 mL/h durante

5 horas) associada à heparina (0,2 U/kg/min durante 5 horas) nas plaquetas, e não houve redução na contagem destas células. HERSON et al. (1989) também descreveram a utilização de ELI (1 g/kg de Intralipid® durante 16 horas) em dez neonatos sem alterações na contagem de plaquetas e na agregação plaquetária. Os resultados encontrados no presente experimento corroboram este estudo, sugerindo que a ELI, assim como o DZ, não predispõe à ocorrência de trombocitopenia.

2.3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A literatura sugere que a ELI pode resultar em alterações como sobrecarga gordurosa, embolismo gorduroso, pancreatite, hepatopatias, injúria renal aguda e SARA (BECKER; YOUNG, 2017; COLOMB et al., 2015; HAYES et al., 2016). Desta forma, avaliação histopatológica e por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada em amostras de pulmão, fígado, pâncreas e rim para avaliação da ocorrência de possíveis lesões.

Após a avaliação macroscópica durante a necropsia, amostras histológicas coradas por HE de pulmão, fígado, pâncreas e rim foram preparadas e avaliadas em todos os animais. Para objetiva avaliação e comparação entres os grupos, foi criada uma tabela de pontuação (Quadro 2.8).

Quadro 2.8 - Ficha de pontuação da avaliação histológica de pulmão, fígado e pâncreas em coelhos.

<p>Pulmão: Degeneração arterial vacuolar ausente = 0 Degeneração arterial vacuolar mínima = 1 Degeneração arterial vacuolar discreta = 2 Degeneração arterial vacuolar moderada = 3</p>
<p>Fígado: Degeneração vacuolar ausente = 0 Degeneração vacuolar discreta = 1 Degeneração vacuolar moderada = 2 Degeneração vacuolar intensa = 3</p>
<p>Pâncreas: Degeneração vacuolar ausente = 0 Degeneração vacuolar mínima = 1 Ausência de pancreatite = 0 Ocorrência de pancreatite = 1</p>

2.3.6.1 PULMÃO

Alterações pulmonares são citadas entre as possibilidades de efeitos adversos causados pela ELI, como SARA e êmbolo pulmonar.

O principal achado histológico pulmonar encontrado em pacientes com SARA é o dano alveolar difuso (DAD), uma doença intersticial característica de lesão pulmonar aguda com alteração grave e ampla alvéolo-capilar. As alterações histológicas observadas podem ser divididas em três fases: exudativa, proliferativa e fibrótica. A fase exudativa é observada nas primeiras 12 a 24 horas após a lesão, com congestão capilar, edema intersticial e intra-alveolar com fibrina. Após as primeiras 24 horas a principal característica é a formação de uma membrana hialina, uma estrutura eosinofílica ao longo dos ductos e paredes alveolares. O epitélio de grande parte da membrana basal alveolar é perdido, e pode ocorrer escasso infiltrado inflamatório intersticial. Uma a duas semanas após a lesão inicial, há o desenvolvimento da fase proliferativa, com tecido de granulação organizado. Neste momento, a membrana hialina já não é mais proeminente. Por último, a fase fibrótica ocorre após três a quatro semanas, quando há completo remodelamento pulmonar pelo tecido de granulação e fibrose uniforme (CASTRO, 2006).

Alteração pulmonar histológica não foi observada em ratos após a administração de 20 ou 40 mL/kg de ELI a 20%. Porém, a infusão de 60 mL/kg resultou em espessamento focal do septo alveolar e presença discreta de histiócitos espumosos intra-alveolares, enquanto uma dose de 80 mL/kg causou congestão vascular hemorrágica.

A possibilidade de êmbolo pulmonar devido à infusão de ELI tem sido motivo de preocupação há anos (HILLER et al., 2010). BARSON, CHISWICK e DOIG (1978) observaram a ocorrência de êmbolos gordurosos pulmonares em crianças que desenvolveram síndrome da sobrecarga gordurosa após a administração prolongada (11 a 18 dias) de NPT com ELI 20% (Intralipid®).

No presente estudo, não foram observadas quaisquer alterações durante a avaliação macroscópica dos pulmões. Não houve à histologia presença de congestão capilar, edema, dano alveolar, infiltrado inflamatório, material lipídico obstruindo os capilares, ou alteração no formato e distensão destes vasos. A única alteração observada foi degeneração vacuolar arterial mínima a moderada em alguns animais (Figura 2.11), porém sem diferença significativa desta ocorrência entre os grupos.

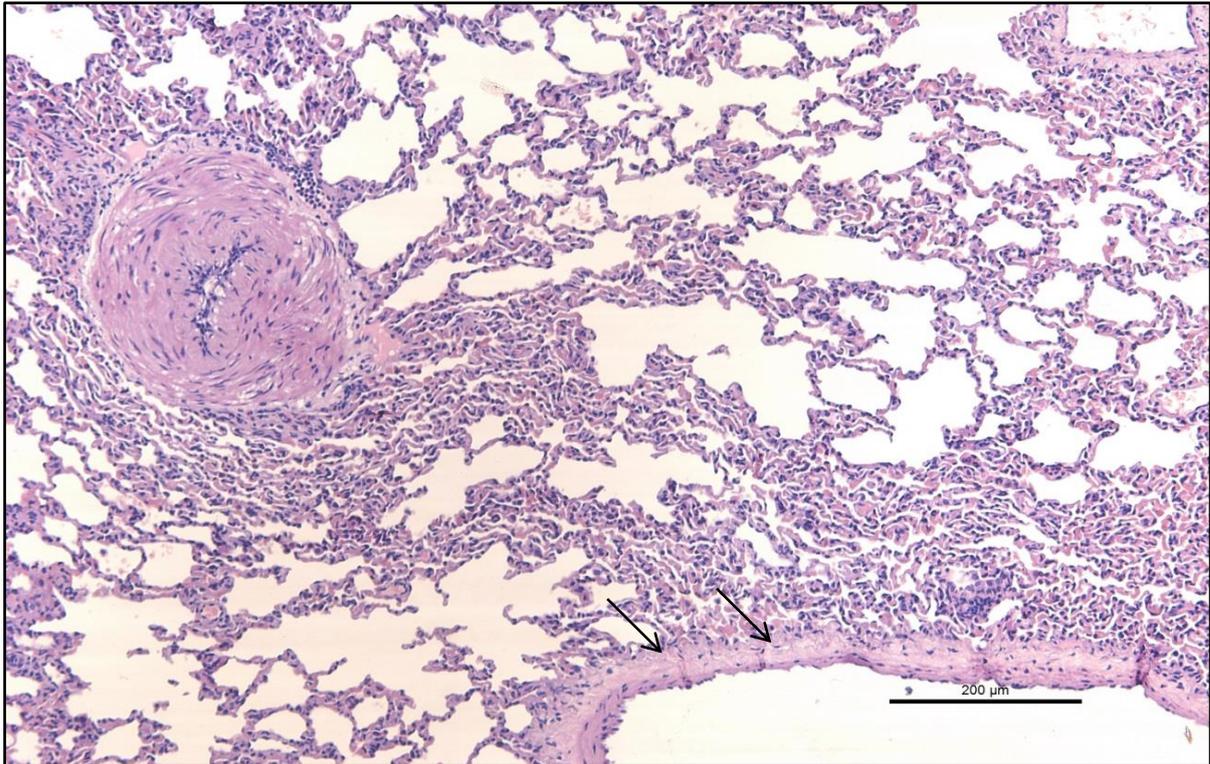


Figura 2.11 - Degeneração vacuolar multifocal mínima (setas) em artéria pulmonar de coelho.

A associação da avaliação macroscópica e histológica pulmonar com os dados clínicos discutidos anteriormente sugere ausência de alterações pulmonares significativas causadas pela ELI.

2.3.6.2 FÍGADO

Alterações hepáticas são associadas com a administração a longo prazo de alimentação parenteral com emulsão lipídica e, potencialmente, também podem ocorrer com o tratamento de intoxicações com as ELI.

Lesão hepática induzida por NPT ocorre com frequência em neonatos que receberam este tipo de tratamento, porém acredita-se que a causa seja multifatorial. A gravidade das alterações encontradas progride com a duração da NPT (ZAMBRANO et al., 2004). Ratos tratados com ELI 20% apresentaram graus diferentes de esteatose microvesicular focal hepática de acordo com a dose administrada. Os que receberam 20 mL/kg apresentavam esta alteração em menos de 1% dos hepatócitos, enquanto os que receberam 60 mL/kg tinham 70 a 80% dos hepatócitos alterados uma hora após o término da infusão (HILLER et al., 2010).

Ao avaliar amostras histológicas do fígado de 24 neonatos que tiveram dano hepático induzido pela NPT e foram a óbito, a alteração mais frequente foi a inflamação peri-portal,

seguida de colestase, proliferação do ducto biliar, hematopoiese extramedular e fibrose. Destas, a colestase geralmente é o primeiro achado. Esteatose hepática também foi observada, porém não foi considerada frequente, além de necrose/apoptose e cirrose. É importante ressaltar que os pacientes que receberam esta dieta por período inferior a duas semanas não apresentaram lesões como fibrose e colestase, ou as apresentavam somente em grau discreto (ZAMBRANO et al., 2004). Por outro lado, não foi observado acúmulo lipídico hepático em quatro crianças que apresentaram síndrome da sobrecarga gordurosa após receberem NPT com ELI durante alguns dias (BARSON; CHISWICK; DOIG, 1978).

O fígado dos coelhos do presente estudo não tinham alterações macroscópicas, e durante a avaliação microscópica foi observada degeneração vacuolar em diferentes graus (Figura 2.12). Assim como relatado durante a avaliação pulmonar, não houve diferença significativa entre os grupos. Em nenhuma amostra avaliada havia alterações sugestivas de colestase, inflamação ou necrose. Amostra hepática de um coelho selecionado aleatoriamente do grupo DZxELI foi enviada para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão, e não foram encontradas alterações.

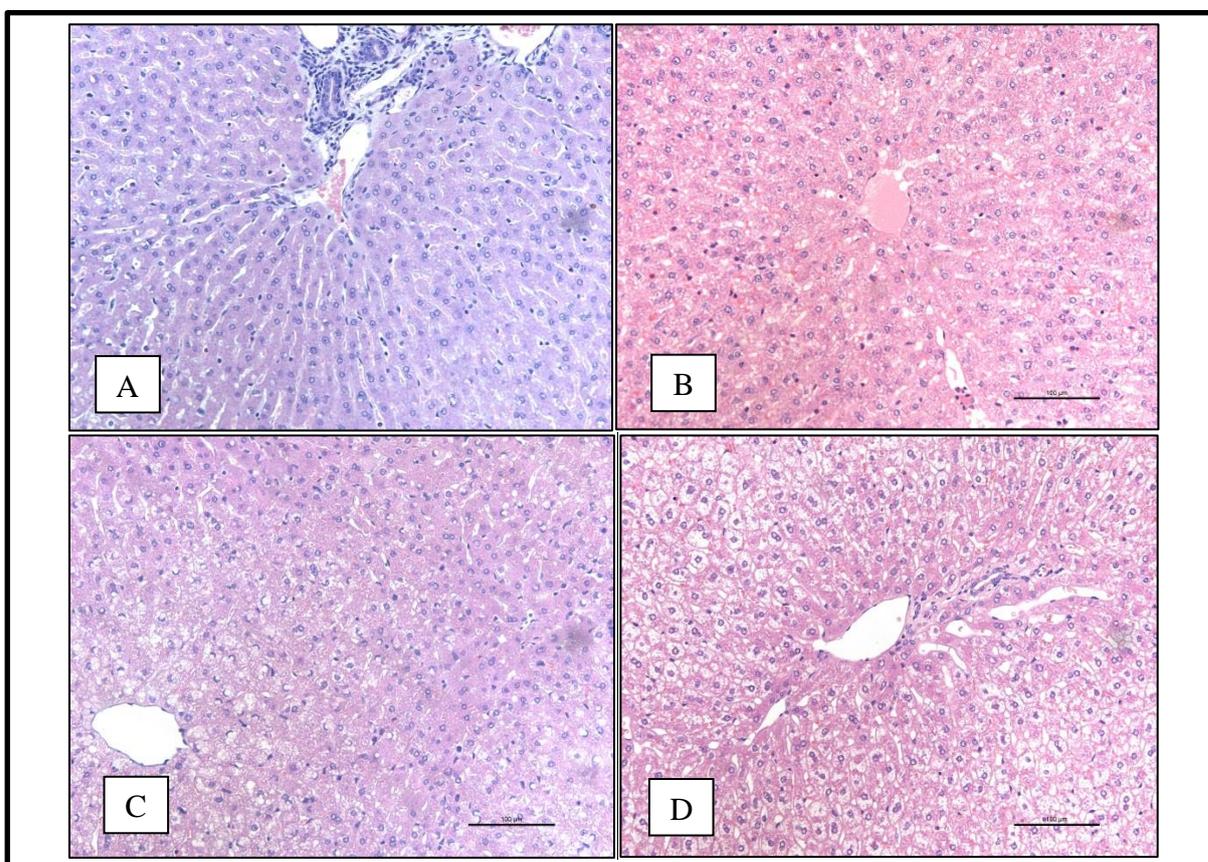


Figura 2.12 - Degeneração vacuolar hepática de diferentes graus em coelhos. A: Sem alterações. B: Discreta. C: Moderado. D: Intensa.

Com base nestes achados, foi considerado que a infusão de ELI 20% não resultou em dano hepático.

2.3.6.3 PÂNCREAS

Sabe-se que a hipertrigliceridemia pode aumentar a susceptibilidade à pancreatite (PAN et al., 2017). Desta forma, é possível que a infusão de altas doses de ELI possa resultar em injúria pancreática, assim como relatado por LEVINE et al. (2014).

Foram observadas alterações pancreáticas em três dos coelhos avaliados, sendo um do grupo DZ, um do DZxR e um DZxELI, porém não foram encontradas mudanças significativas nos grupos ELI e R. Os animais dos grupos DZ e DZxELI apresentavam degeneração vacuolar mínima de alguns ácinos do pâncreas exócrino (Figura 2.13), enquanto no do grupo DZxR foi encontrada área focal de formação de fendas de colesterol associadas a alguns macrófagos de citoplasma vacuolizado (pancreatite histiocitária focal moderada). Neste último, foi observado aumento da atividade da amilase de 295 para 328 UI/L, e nos demais foi observada redução da atividade enzimática. Para comparação estatística entre os grupos, foram utilizadas duas pontuações: uma referente à ocorrência de vacuolização e outra referente à de pancreatite (Quadro 2.8). Em nenhuma das duas, foi encontrada diferença estatística entre os grupos.

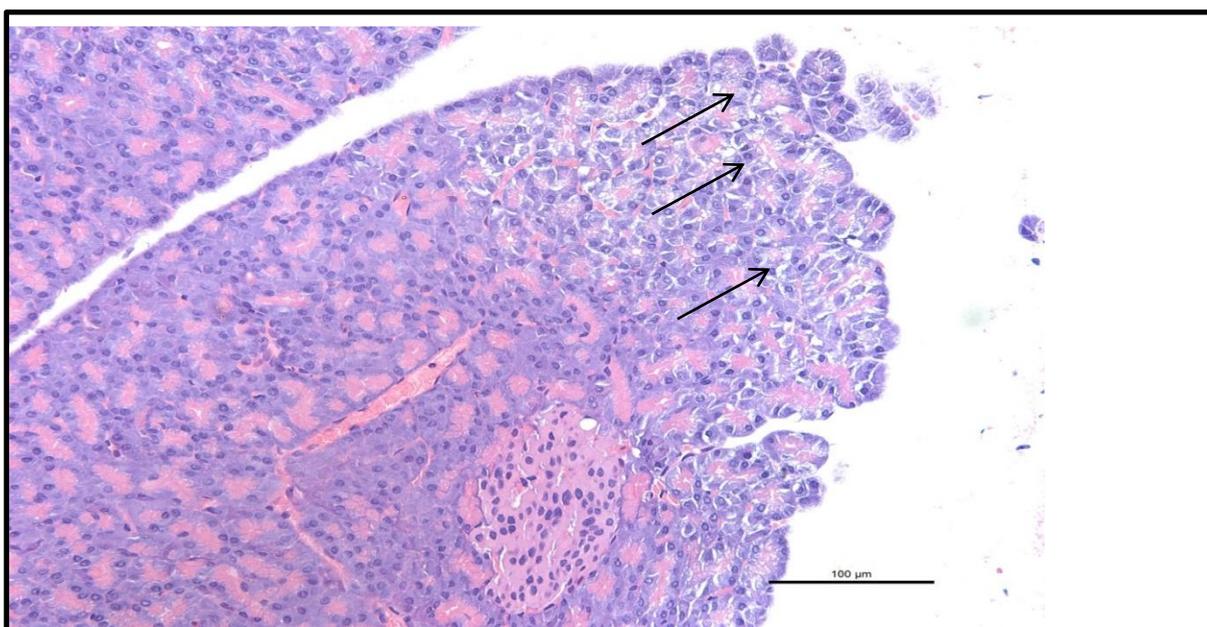


Figura 2.13 - Degeneração vacuolar multifocal mínima (setas) em pâncreas de coelho do grupo DZxELI.

A ausência de lesão significativa nos animais dos grupos DZxELI e ELI sugere que a ELI não resultou em injúria pancreática. Este achado vai de acordo com os de HILLER et al. (2010), em que o pâncreas de ratos tratados com 20, 40, 60 ou 80 mL/kg de ELI 20%, administrada durante 30 minutos, foi avaliado histologicamente em três momentos diferentes (1, 4 e 24 horas após o fim da infusão). Em nenhum deles, foi observada alteração pancreática, mesmo com a administração da dose mais alta, quase 10 vezes maior do que a administrada neste experimento. É possível que a pancreatite observada em um animal do grupo DZxR tenha sido somente um achado acidental, uma vez que não foram encontrados estudos em que houve associação direta da utilização de DZ ou ringer lactato com o desenvolvimento deste tipo de lesão. Inclusive, há relatos de que estes fármacos podem apresentar efeito anti-inflamatório em indivíduos com pancreatite (ABED et al., 2013; IQBAL; ANWAR; SCRIBANI, 2018).

Amostra pancreática de dois animais, um do grupo DZ e um do ELI, selecionados aleatoriamente, também foram submetidas à avaliação por microscopia eletrônica de transmissão. Nelas, não foram observados sinais de necrose ou injúria celular compatíveis com pancreatite (Figura 2.14), corroborando os achados histológicos.

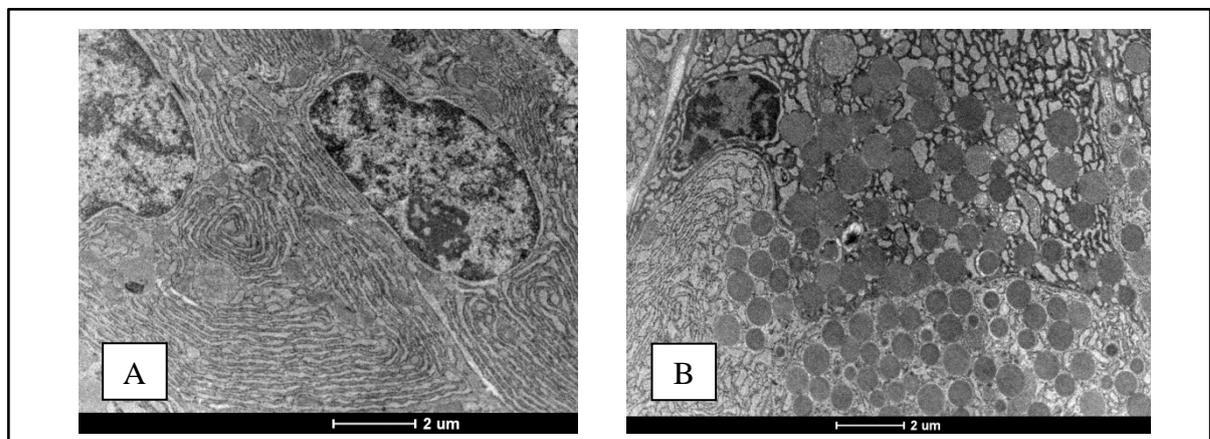


Figura 2.14 - Microscopia eletrônica de transmissão em amostras pancreáticas de coelho. A: É possível observar manutenção do formato e definição normal das estruturas celulares em amostra de um animal do grupo ELI. Presença de grande concentração de retículo endoplasmático (característica da célula acinar), e núcleo esférico na região basal com nucléolo proeminente e agregados de heterocromatina periféricos. B: Destaque para os grânulos de zimogênio em amostra de um animal do grupo DZ.

2.3.6.4 RIM

A avaliação histológica renal não demonstrou alterações compatíveis com dano renal em nenhum dos grupos, o que sugere que o DZ e a ELI não alteraram significativamente este órgão.

2.4 CONCLUSÕES

A administração de ELI (Lipovenos® MCT 20%), em *bolus* de 1,5 mL/kg seguido de infusão contínua na taxa de 0,25 mL/kg/min durante 30 minutos, não interferiu no efeito clínico do DZ em coelhos. Entretanto, embora pouco provável, a possibilidade de recorrência da ação sedativa deve ser considerada, especialmente quando há o envolvimento de fármacos com meia-vida de eliminação muito superior à meia-vida de eliminação da ELI utilizada. Desta forma, recomenda-se que o paciente seja cuidadosamente monitorado por algumas horas após a administração da ELI. Apesar dos altos níveis de TG encontrados após a sua administração e da ocorrência de acidose metabólica, a utilização da ELI foi considerada segura, sem evidências de dano pulmonar, hepático, pancreático ou renal, ou ocorrência de reações de hipersensibilidade. Entretanto, esta infusão deve ser utilizada com cautela em pacientes que já apresentam estado clínico que predispõe à redução do pH sanguíneo. Quando utilizada em associação ao DZ, há risco de ocorrência de acidose mista que, apesar de provavelmente ser transitória, deve ser meticulosamente monitorada através de hemogasometria arterial. Também não ocorreu hemólise ou trombocitopenia, e acredita-se que a leucopenia observada após a infusão da ELI é transitória. Vale ressaltar que não foram encontradas evidências que apoiem a ocorrência de efeito vasoconstritor ou inotrópico após a utilização desta ELI.

3. INTERFERÊNCIA DA EMULSÃO LIPÍDICA INTRAVENOSA NAS ANÁLISES LABORATORIAIS

3.1 REVISÃO DE LITERATURA

Altas doses séricas de TG causando lipemia sabidamente interferem em algumas avaliações laboratoriais (ANDRADE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016; CAO et al., 2015; GRUNBAUM et al., 2012). LEVINE et al. (2014) consideram como interferência laboratorial a incapacidade de realizar estudos bioquímicos por período superior a duas horas após a infusão IV.

Os exames baseados na transmissão da luz, como a espectrofotometria e os colorimétricos, são os mais afetados em amostras lipêmicas devido à turbidez ou dispersão de luz, alterando a absorbância (ANDRADE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016; BORNHORST; ROBERTS; ROBERTS, 2004; DIMESKI, 2009; GRUNBAUM et al., 2012; KROLL; ELIN, 1994).

Sistemas que utilizam eletrodo íon-seletivo (ISE) indireto também são muito afetados (DIMESKI, 2009). Durante a mensuração por este método, a lipemia resulta em falsa redução da concentração de eletrólitos ao diminuir o componente aquoso da amostra, pois o volume ocupado pela grande quantidade de lipídios, deslocando a água, é incluído no cálculo da concentração dos analitos. Desta forma, o plasma passa a apresentar menor quantidade de água e de eletrólitos por unidade de volume (DIMESKI, 2009; LYON; BASKIN, 2003). Os instrumentos automatizados de análises bioquímicas utilizam um volume constante de diluentes durante as reações realizadas para as quantificações. Como há redução na quantidade de água e eletrólitos no plasma, este procedimento resulta em diluição excessiva da amostra (LYON; BASKIN, 2003).

Esta redução artificial da concentração dos eletrólitos não é esperada durante a utilização de métodos com ISE direto, como nos hemogasômetros. Estes métodos são considerados mais acurados. Uma vez que a amostra não é pré-diluída e a mensuração é realizada somente na fração aquosa, a avaliação não é alterada pela lipemia (DIMESKI, 2009; KROLL; ELIN, 1994).

A falta de homogeneidade da amostra lipêmica também pode ser uma das causas de alterações nas análises laboratoriais. Após a centrifugação para obtenção do plasma ou soro, as partículas se distribuem de acordo com a sua densidade, e as moléculas de lipídios maiores

tendem a se separar e ficar na fração mais superior da amostra, enquanto os analitos se distribuem na camada de acordo com a sua polaridade. As probes da maioria dos aparelhos de mensuração aspiram uma alíquota da camada mais superior, o que pode subestimar a concentração dos analitos solúveis na fase aquosa, como os eletrólitos, e exacerbar os efeitos de interferência (DIMESKI, 2009; NIKOLAC, 2014).

Amostras lipêmicas também podem causar alterações em imunoenaios ao bloquear os sítios de ligação dos anticorpos e interferir na ligação antígeno-anticorpo (NIKOLAC, 2014).

A administração da ELI pode impedir durante horas a avaliação de parâmetros importantes, como glicose, HCT, leucócitos, eletrólitos e status ácido-base (HOJER et al., 2016). O tempo de interferência laboratorial é variável. Um paciente intoxicado por bupivacaína recebeu *bolus* de 2 mL/kg de ELI a 20%, seguido de 0,25 mL/kg/min durante 3 horas. Uma hora após o final da infusão foi possível realizar as análises laboratoriais sem interferências. Por outro lado, um paciente intoxicado por verapamil tratado com ELI (*bolus* de 1,5 mL/kg seguido de infusão contínua na taxa de 0,25 mL/kg/min durante 30 minutos) teve suas análises bioquímicas impedidas durante 25 horas devido à lipemia (LEVINE et al., 2014), e uma mulher intoxicada tratada com ELI 20% manteve interferência causada pela lipemia por aproximadamente 21 horas, impedindo a realização de vários exames bioquímicos, hematológicos, de coagulação, e de análise de gases sanguíneos (JOHNSON-ARBOR; SALINGER; LUCZYCKI, 2015). Em pacientes críticos, a inabilidade de realização de forma confiável das análises laboratoriais pode prejudicar um tratamento adequado. Assim, recomenda-se a coleta de amostras antes do início da terapia com ELI (GRUNBAUM et al., 2012; LEVINE et al., 2014).

Ao contrário de outras interferências, a lipemia pode ser removida da amostra, permitindo análises sem interferência, pelos procedimentos de centrifugação com ultracentrífuga, extração ou diluição. O método deve ser escolhido com cautela de acordo com a avaliação que será realizada (NIKOLAC, 2014).

A ultracentrifugação permite a remoção dos lipídios, que se acumulam na fração superior da amostra. Esta técnica, porém, não é adequada para a avaliação de analitos hidrofóbicos, pois estes seriam removidos junto com o sobrenadante. Este processamento se torna pouco acessível devido ao seu alto custo, não sendo encontrado em vários laboratórios (NIKOLAC, 2014). Entretanto, LEVINE et al. (2014) observaram interferência laboratorial pela lipemia apesar de ultracentrifugação em quatro de nove pacientes intoxicados medicados

com ELI. BORNHORST, ROBERTS e ROBERTS (2004), DIMESKI (2009) e JOHNSON-ARBOR, SALINGER e LUCZYCKI (2015) relataram que a ultracentrifugação não removeu completamente os lipídios, sendo mais eficiente na remoção das moléculas lipídicas maiores, como os quilomícrons, mas não na remoção completa dos lipídios. As ELI a base de óleo de soja apresentam principalmente lipídios menores (BORNHORST; ROBERTS; ROBERTS, 2004).

Solventes polares podem auxiliar na extração dos lipídios das amostras, que após centrifugação precipitam, e as análises são então feitas com o sobrenadante. Entretanto, alguns analitos apresentam grande perda durante o processamento (NIKOLAC, 2014).

Estes procedimentos de remoção dos lipídios não podem ser realizados para a mensuração de substâncias lipofílicas, pois por se distribuírem na fase lipídica também seriam removidas, gerando resultados falsamente baixos. Nestes casos, indica-se a diluição da amostra em salina. Esta é considerada a melhor forma para a mensuração de drogas terapêuticas em amostras lipêmicas. É importante saber os limites de interferência dos TG, e ter cuidado para que a diluição seja suficiente para retirar a turbidez da amostra sem que a concentração final saia da faixa analítica do método utilizado (ANDRADE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016; BORNHORST; ROBERTS; ROBERTS, 2004; DIMESKI, 2009; NIKOLAC, 2014).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar quais exames laboratoriais foram alterados ou prejudicados pela lipemia gerada após a infusão da ELI (Lipovenos[®] MCT 20%), além de verificar a eficiência do processo de diluição e diferentes formas de extração em contrapor esta interferência.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Protocolo 307/2018).

3.2.1 GRUPOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 12 coelhos machos, adultos, Nova Zelândia, com aproximadamente três a quatro quilogramas (por volta de 150 dias de vida), provenientes da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da EV-UFMG, no município de Igarapé.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (seis coelhos em cada) (Quadro 3.1), e mantidos em gaiolas metálicas individuais (aproximadamente 75cm de comprimento por 30 cm de largura e 45cm de altura). Água e ração comercial foram fornecidas *ad libitum*. A primeira coleta das amostras de sangue para realização dos exames laboratoriais (hemograma e perfil bioquímico) foi realizada em todos os animais uma semana antes do início dos procedimentos experimentais, por meio de cateterização da artéria auricular, e este foi referido como o momento basal destes animais.

Quadro 3.1 – Diferentes desafios e tratamentos realizados em cada grupo experimental.

Grupo	Desafio	Tratamento
DZxELI	Diazepam, 1 mg/kg (0,2 mL/kg), IV.	ELI 20% (1,5 mL/kg + 0,25 mL/kg/min durante 30 min, IV).
ELI	NaCl 0,9% (0,2 mL/kg), IV.	ELI 20% (1,5 mL/kg + 0,25 mL/kg/min durante 30 min, IV).

No dia dos procedimentos experimentais, foi obtido acesso venoso (veia auricular marginal) e arterial (artéria auricular) em todos os animais, com auxílio de cateter¹⁴ n.22. Este foi acoplado a um dispositivo PRN¹⁵ e fixado nas orelhas com esparadrapo.

No tempo zero (T0), referente ao início dos procedimentos experimentais, foi realizada coleta de sangue para realização de hemogasometria arterial, seguida da administração de DZ (1 mg/kg, em volume de 0,2 mL/kg, IV) aos animais dos grupos DZxELI. Os animais dos grupos ELI receberam ao invés do DZ volume equivalente (0,2 mL/kg) de solução NaCl 0,9%¹⁶, IV. Após um intervalo de 10 minutos (T1) os animais foram submetidos a coleta de sangue. Nesse momento, os animais receberam ELI 20%¹⁷ por via IV (*bolus* inicial de 1,5 mL/kg seguido de infusão contínua na taxa de 0,25 mL/kg/min durante 30 minutos). Após os 30 minutos (T2) nova coleta de sangue foi realizada, e assim sucessivamente em intervalos de 20 minutos (T3, T4 e T5). No momento T5, também foi realizada hemogasometria arterial (Figura 3.1). A dose de DZ administrada está dentro da dose sedativa (1 – 2 mg/kg) e antiepiléptica (0,5 – 2 mg/kg) preconizada para coelhos (DECUBELLIS, 2016; HARCOURT-BROWN, 2004; KEEBLE, 2006; VARGA, 2013b).

¹⁴ Catéter Intravenoso BD Insyte™, Becton Dickison Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

¹⁵ BD PRN Adapter Luer-Lock, Becton Dickison Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

¹⁶ Cloreto de sódio a 0,9%, Fresenius Kabi Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

¹⁷ Lipovenos® MCT 20%, Fresenius Kabi Áustria GmbH, Graz, Áustria.

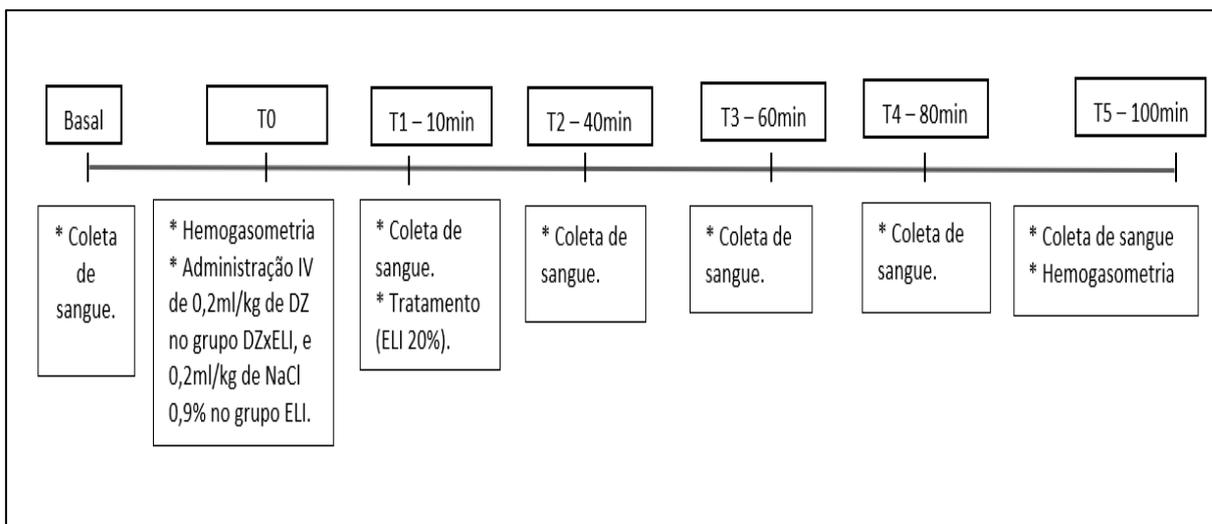


Figura 3.1 - Linha do tempo dos procedimentos experimentais realizados.

3.2.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

Em cada momento de coleta pelo catéter arterial, foram obtidos 3,0 mL de sangue (valor de acordo com National Centre For The Replacement Refinement & Reduction Of Animals In Research, 2019). Desta amostra, 1,5 mL foram acondicionados em tubo com EDTA¹⁸ para realização dos exames hematológicos em aparelho de contagem eletrônica¹⁹ e posterior centrifugação (4.000 rpm durante 8 minutos) e separação do plasma. Foram determinados com um analisador hematológico a RBC, contagem total de leucócitos e plaquetas, HCT, HB e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM). O plasma obtido foi congelado e posteriormente utilizado para realização dos exames toxicológicos, com extração e quantificação do DZ pela metodologia de QuEChERS modificado e leitura por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O aparelho utilizado foi o cromatógrafo a líquido Shimadzu® com controlador SCL-10A, bomba LC-10AD com degasificador DGU-14A, injetor SIL-10AD, forno de coluna CTO-10A, detector UV SPD-M10A e software 6.14 SPZ. O restante do sangue (1,5 mL) foi acondicionado em um tubo sem anticoagulante²⁰ para centrifugação (4.000 rpm durante 8 minutos) e separação do soro. Este foi utilizado para realização da avaliação bioquímica, composta pela análise da atividade sérica da amilase, ALT, AST, FA e GGT, e dosagem sérica da creatinina, ureia, glicose, TG, colesterol, PT e albumina. As análises bioquímicas foram realizadas com kits laboratoriais (Kovalent®) em analisador bioquímico²¹. Nos tempos T0 e

¹⁸ Vacutube EDTA.K3 a 15%, Biocon® Diagnósticos, Minas Gerais, Brasil.

¹⁹ Analisador hematológico veterinário Sysmex poch-100iV Diff®, Sysmex do Brasil Ltda, Paraná.

²⁰ Vacutube ativador de coágulo, Biocon® Diagnósticos, Minas Gerais, Brasil.

²¹ Analisador Bioquímico Cobas Mira Plus®, Roche Diagnóstico Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

T5, também foi coletado 0,6 mL de sangue arterial, com seringa contendo heparina lítica, para realização de hemogasometria arterial.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 HEMOGASOMETRIA

A hemogasometria utiliza métodos com ISE direto, sendo menos susceptível à interferência pela lipemia (DIMESKI, 2009).

DIMESKI (2009) relatou que segundo a sua experiência as concentrações de lipídios encontradas após a utilização de apresentações lipídicas comerciais não impedem completamente a mensuração de eletrólitos pelos hemogasômetros. De forma similar, no atual estudo nenhuma das mensurações realizadas pelo hemogasômetro foi prejudicada pela lipemia presente nas amostras dos grupos DZxELI e ELI (dados apresentados anteriormente no capítulo 2).

3.3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS SÉRICAS

A lipemia, seja de origem endógena ou pela administração de emulsões lipídicas comerciais, interfere em diversos testes laboratoriais devido a interações físicas ou químicas (DIMESKI, 2009; NIKOLAC, 2014).

Segundo as instruções de uso dos reagentes utilizados (Kovalent[®]), todos os métodos de análise foram baseados na transmissão da luz (Quadro 3.2). Desta forma, estes eram muito susceptíveis à interferência pela lipemia (ANDRADE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016; BORNHORST; ROBERTS; ROBERTS, 2004; DIMESKI, 2009; GRUNBAUM et al., 2012; KROLL; ELIN, 1994). A empresa produtora dos reagentes também estabeleceu os limites mínimos da concentração de TG necessários para causar interferências nestes exames, variando de 500 mg/dL a 2000 mg/dL (Quadro 3.2). Os coelhos tratados com ELI apresentaram no presente estudo concentração média de TG próxima de 3000 mg/dL. Desta forma, interferência já era esperada.

Quadro 3.2 - Método de avaliação dos analitos, concentração mínima de TG necessária para gerar interferência, e comprimento de onda em que a leitura destes é realizada segundo as instruções de uso dos reagentes (Kovalent®).

Analito	Método Utilizado	Concentração de Triglicérides	Comprimento de Onda
Albumina	Teste fotométrico	Acima de 500 mg/dL.	546nm
PT	Teste fotométrico	Acima de 1000 mg/dL	540nm
Ureia	Teste fotométrico	Acima de 2000 mg/dL	340nm
Creatinina	Teste cinético em sistema fotométrico	Acima de 2000 mg/dL	492nm
AST	Teste UV otimizado	Acima de 2000 mg/dL	340nm
ALT	Teste UV otimizado	Acima de 2000 mg/dL	340nm
FA	Teste cinético colorimétrico	Acima de 2000 mg/dL	400 - 420nm
GGT	Teste cinético colorimétrico	Acima de 2000 mg/dL.	400 - 420nm
Amilase	Teste fotométrico enzimático	Acima de 1000 mg/dL	405nm
Colesterol	Teste fotométrico enzimático	Acima de 2000 mg/dL	500nm
TG	Teste colorimétrico enzimático	Acima de 2000 mg/dL	500nm
Glicose	Teste colorimétrico enzimático	Acima de 2000 mg/dL	500nm

A determinação da concentração de PT, albumina, ureia, creatinina e colesterol, e da atividade das enzimas AST, ALT, FA, GGT e amilase foi prejudicada nas amostras lipêmicas, dos grupos DZxELI e ELI (dados apresentados no capítulo 2).

Na primeira mensuração da concentração de TG, foi observado que a concentração obtida estava acima da faixa de medição do reagente (limite máximo de 2000 mg/dL). Então, foi realizada diluição de acordo com a recomendação do fabricante, na proporção de 1:4 de NaCl 0,9%. Os resultados obtidos foram multiplicados por 5 para a obtenção do valor real. Este procedimento foi realizado em duplicata, e apresentou repetibilidade, sendo considerado adequado e confiável.

Uma vez que os métodos de avaliação de AST e ALT utilizam reações em que a mudança de absorvância é medida a 340nm, e esta absorção é inversamente proporcional ao comprimento de onda utilizado, estes testes geralmente são muito alterados pela lipemia (ANDRADE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016; NIKOLAC, 2014). Durante a avaliação da atividade

enzimática de AST, ALT, FA e amilase nas amostras coletadas em T5 nos grupos DZxELI e ELI foi observada a mensagem “>SAMPLE LIMIT” no analisador bioquímico, identificando que a diferença entre a absorbância da amostra sérica e da amostra branca do reagente ultrapassou o limite de leitura programado. De acordo com o manual do equipamento, esta observação é causada por amostras hemolisadas, ictéricas ou lipêmicas e, apesar dos valores serem considerados válidos pelo equipamento, é sugerido que o laboratório realizando as análises siga protocolo próprio. Desta forma, não é possível afirmar com confiança que os resultados obtidos não sofreram interferência da lipemia. Os valores médios de FA e amilase encontrados, descritos no capítulo 2, estavam abaixo do esperado. Segundo DIMESKI (2009), a interferência causada por amostras lipêmicas geralmente resulta em subestimação dos resultados.

Das amostras dos grupos DZxELI e ELI, o analisador bioquímico fez leitura da atividade de GGT somente em duas, e em ambas foi observado a mensagem referente à diferença de absorbância pela lipemia, como citado na análise de AST, ALT e FA. Na tentativa de reduzir o efeito das lipoproteínas, foi realizada diluição na proporção de 1:2 de NaCl 0,9%, entretanto não houve leitura em nenhuma das amostras.

As recomendações dos reagentes destacam que concentrações de até 2000 mg/dL de TG não afetam a avaliação da concentração sérica de ureia e creatinina, realizada por métodos fotométricos, porém os coelhos apresentavam esta concentração próxima a 3000 mg/dL. Desta forma, foi realizada diluição 4:1 com NaCl 0,9% como tentativa de reduzir a lipemia e permitir adequada mensuração destes analitos. Somente duas amostras de ureia permaneceram sem ser mensuradas, as quais eram de coelhos do grupo DZxELI que apresentavam os dois valores mais altos de concentração de TG (4668 mg/dL e 4112 mg/dL). Por outro lado, mesmo com esta diluição, 55% das amostras não apresentaram mensuração de creatinina pelo analisador bioquímico. Dos valores obtidos, as concentrações séricas de ureia foram consideradas adequadas, enquanto os valores de creatinina estavam muito abaixo do esperado. Considerou-se que a diluição na proporção 1:4 de NaCl 0,9% pode auxiliar na avaliação da concentração de ureia em amostras com até 3800mg/dL de TG (valor máximo encontrado nas amostras mensuradas após a diluição), porém sem benefícios na análise de creatinina.

Diluição com NaCl 0,9% (1:2) também foi realizada para a quantificação da concentração sérica de PT e albumina, as quais não são afetadas na presença de concentrações séricas de TG de até 1000 mg/dL e 500 mg/dL, respectivamente. Várias amostras continuaram

sem ser mensuradas, e os valores obtidos da concentração de albumina permaneceram superiores aos de PT, demonstrando que estes resultados não eram confiáveis.

Durante a avaliação da concentração de colesterol, sem diluição, o analisador bioquímico não conseguiu fazer a análise em nenhuma das amostras dos grupos medicados com ELI, indicando que não foi observada reação, ou que houve reação na direção oposta à programada. Segundo o manual do equipamento, recomenda-se diluição e repetição do processo. Foi realizada diluição com NaCl 0,9% na proporção 1:1 e 1:4, sem qualquer benefício. Desta forma, é sugerido que a lipemia impediu a mensuração do colesterol no soro dos coelhos medicados com ELI.

A mensuração da concentração de glicose não apresentou aparentes interferências significativas.

Ao avaliar a interferência analítica causada pela emulsão lipídica, GRUNBAUM et al. (2012) observaram alteração significativa na análise de albumina, enquanto a creatinina, PT e ALT se tornaram imensuráveis. A análise de glicose pelo método colorimétrico também foi propensa a erro. Por outro lado, não houve alteração na quantificação de ureia. ANDRADE, OLIVEIRA e SOUZA (2016) utilizaram a diluição para a análise de uma amostra muito lipêmica, e obtiveram sucesso na avaliação de FA, AST, ALT, glicose, GGT, amilase, ureia e bilirrubina total e direta, porém este procedimento não foi efetivo em remover a interferência durante a quantificação de creatinina. BRANCO (2015) separou o sobrenadante lipêmico de amostras de coelhos que receberam ELI 20% (LCT), e este procedimento permitiu adequada avaliação da ureia, creatinina, glicose ALT, AST, FA e GGT, porém ainda houve interferência nos resultados de PT e albumina.

É possível que a divergência entre estes resultados e os obtidos no presente experimento seja não somente devido a diferenças na concentração de lipoproteínas e composição destas, mas também dos reagentes e aparelhos utilizados. O tipo e a intensidade da interferência podem variar com diferentes metodologias de mensuração (DIMESKI, 2009; NIKOLAC, 2014). Segundo BORNHORST, ROBERTS e ROBERTS (2004), a interferência causada pelos lipídios provenientes de ELI aparenta ser menor do que a gerada por lipídios endógenos.

Assim como constatado por outros autores, é possível observar como a lipemia pode prejudicar o diagnóstico e a monitoração de determinadas condições clínicas (ANDRADE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016). JOHNSON-ARBOR, SALINGER e LUCZYCKI (2015)

relatarem que esta interferência, causada pela administração de ELI 20% em uma mulher intoxicada, impediu a monitoração dos gases sanguíneos enquanto esta era mantida na ventilação mecânica, prejudicando o adequado acompanhamento e tratamento da paciente. No presente estudo, é possível que um intervalo mínimo de 4 horas após o final da infusão, tempo em que houve redução visual significativa da lipemia no projeto piloto, seja necessário para que não haja mais interferência e as análises possam ser feitas com segurança.

3.3.3 ANÁLISES ERITROCITÁRIAS

As únicas mensurações do eritrograma que sofreram interferência nas amostras lipêmicas foram a concentração de HB, o CHCM e o HCM, sendo que os dois últimos são calculados a partir do primeiro e do volume globular pela fórmula $CHCM(g/dL) = [HB] (g/dL) \times 100/VG (\%)$ (PAES; LEME; CARNEIRO, 2009).

A lipemia pode alterar a quantificação da HB realizada por espectrofotometria (ANDRADE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016). Desta forma, a HB observada em T5 nos grupos ELI e DZxELI (capítulo 2) foi considerada superestimada devido à interferência da lipemia, assim como citado por PAES, LEME e CARNEIRO (2009). De forma similar, BRANCO (2015) também observou a superestimação dos níveis da HB em coelhos tratados com ELI.

Segundo ANDRADE, OLIVEIRA e SOUZA (2016), a correção da quantificação da HB e da determinação de outros parâmetros eritrocitários, como o HCT, VCM e CHCM seria possível com a substituição do plasma lipêmico, após centrifugação, por NaCl 0,85%. Entretanto, este procedimento não foi realizado com as amostras dos coelhos deste experimento.

3.3.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

3.3.4.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para quantificação do DZ, primariamente é necessário o desenvolvimento e validação do método analítico. Nesse estudo, inicialmente, foi proposto método empregando cromatografia a líquido e detecção por UV.

A fase móvel (FM) inicialmente utilizada era constituída de 40% de acetonitrila (ACN), 40% de metanol (MEOH) e 20% de água (H₂O), o volume de injeção foi de 50 µL, a vazão de 1,0 mL/min e a temperatura de forno igual a 40°C. O comprimento de onda determinado para

a quantificação foi de 228, assim como citado por FREIRE et al. (2005) e MERCOLINI et al. (2009).

Para a determinação da faixa de concentração de DZ a ser testada, a sua concentração plasmática máxima (C_0) após a administração de 1 mg/kg em coelhos de aproximadamente 3,5 kg foi estimada. Para tal, foi utilizada a fórmula:

$$C_0 = \frac{\text{Massa administrada}}{V_d}$$

Assim, considerando a massa administrada 3,5 mg e V_d de 7000 mL, $C_0 = 0,5 \mu\text{g/mL}$.

Com este dado, foram previstas possíveis concentrações sanguíneas de DZ que poderiam ser obtidas nos animais em estudo, e definiu-se qual faixa de concentração deveria ser testada e utilizada no desenvolvimento do método analítico. A solução *stock* foi preparada com a dissolução de 1 mg de DZ²² em 10 ml de metanol (100 $\mu\text{g/mL}$). A partir desta, por diluições sucessivas, soluções padrão foram obtidas nas concentrações de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, 0,8 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,10 $\mu\text{g/mL}$ que foram utilizadas posteriormente no controle de qualidade e validação da metodologia. Solução de trabalho com DZ foi preparada ao transferir 1 mL da solução *stock* para um balão com 50 mL de metanol, resultando em concentração de 2 $\mu\text{L/mL}$. O padrão interno (PI) escolhido foi o bromazepam (BZ), e a sua solução padrão foi preparada com 1 mg do agente diluído em 10 mL de metanol (100 $\mu\text{g/mL}$). Uma alíquota de 1 mL desta solução foi misturada a 10 mL de metanol, resultando na solução de trabalho do PI (10 $\mu\text{g/mL}$).

A primeira coluna testada foi uma Zorbax C_{18} de 25 cm. Foi realizada injeção da solução de trabalho de DZ a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ nas condições citadas anteriormente, porém em 35 minutos de tempo de corrida não foi observado pico do DZ, e tempo superior a este tornaria o exame inviável.

Em seguida, a coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) foi utilizada. As soluções padrão de DZ (0,10 $\mu\text{g/mL}$) e PI (10 $\mu\text{g/mL}$) foram injetadas e resultaram em picos adequados, sendo o do PI em 2,4 minutos, e o de DZ em 3,5 minutos. Esta coluna foi, então, considerada adequada para a análise. Como tentativa de distanciar o tempo de retenção do DZ do pico do volume morto, evitando interferências, a FM foi modificada reduzindo a sua fração orgânica (35 ACN : 35 MEOH : 30 H_2O) e foram injetadas soluções de DZ nas concentrações de 1,0

²² Substância Química de Referência Diazepam, Farmacopéia Brasileira, Lote 1044.

$\mu\text{g/mL}$, 0,8 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,10 $\mu\text{g/mL}$, e a do PI. Observou-se em todas as amostras, como esperado, aumento do tempo de retenção dos fármacos (BZ em 4,40 minutos e DZ em 7,32 minutos) (Figura 3.2).

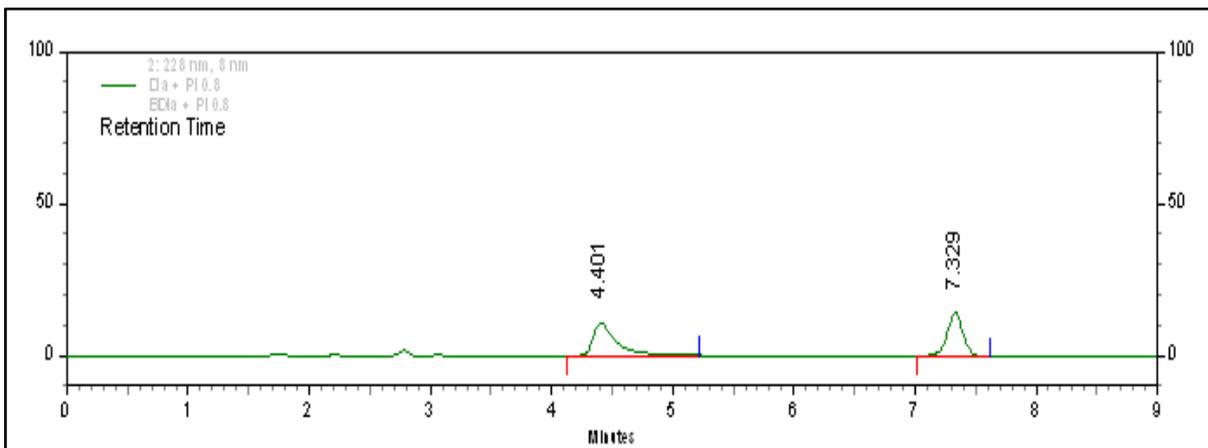


Figura 3.2 - Cromatograma de solução do PI BZ (10 $\mu\text{g/mL}$) e de DZ (0,5 $\mu\text{g/mL}$) em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 35 ACN : 35 MEOH : 30 H₂O a um fluxo de 1,0 mL/min. O PI apresentou pico em 4,40 minutos, e o DZ em 7,32 minutos.

3.3.4.2 DETERMINAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO (PRÉ-TRATAMENTO)

A partir da definição das condições cromatográficas, foram iniciados os testes com soro, o qual foi coletado de coelhos Nova Zelândia machos, com a mesma origem dos animais utilizados no experimento, e que não haviam sido expostos a medicamentos. Duas amostras foram preparadas em tubos cônicos, uma com soro branco (500 μL) e uma com soro (500 μL) enriquecido com 5 μL de cada solução de trabalho (BZ e DZ). Ambas foram submetidas à extração por precipitação de proteínas, com adição de 2 mL de ACN e agitação em vórtex por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante cinco minutos (Centrífuga Jouan® MR23i), o sobrenadante (1,8 mL) foi transferido para um novo tubo e evaporado em concentrador (Tecnal® TecVap TE-OI94) a 40°C. O material foi ressuscendido em 500 μL da FM (35 ACN : 35 MEOH : 30 H₂O) e agitado em vórtex durante 1 minuto. As amostras foram filtradas (Millex – HV com membrana de PVDF, 0,45 μm de poro e 13mm de diâmetro), transferidas para um *vial* e injetadas no HPLC. Foi observado um pico interferente próximo ao tempo de retenção do PI, então teste foi realizado com a mudança da FM para 40 ACN : 40 MEOH : 20 H₂O, porém não houve melhora significativa.

Duas amostras (tempos T1 e T2) de um animal do grupo DZxELI foram enriquecidas com 25 µL da solução de trabalho do PI e submetidas à extração por precipitação de proteínas citada anteriormente, porém apesar de no tempo T1 os picos dos padrões terem sido adequados para a avaliação, em T2 havia vários picos interferentes que impossibilitavam a avaliação. Optou-se pela utilização de tampão fosfato (TF) na FM, como citado por FREIRE et al. (2005) (KH_2PO_4 0,01 mol/L, pH 3,5), porém com constituição de 40 ACN : 40 MEOH : 20 TF. Tampão fosfato acidificado já foi utilizado por outros autores como um dos constituintes da FM (MERCOLINI et al., 2009; ROUINI et al., 2008). Com a nova FM, o pico de BZ ficou mais intenso, e apesar de haver menos interferências, elas ainda prejudicavam a avaliação. Desta forma, a busca de outra metodologia de extração foi considerada para que a matriz da amostra do animal medicado tratado com ELI fosse mais purificada.

Foi realizada tentativa de extração em fase sólida (SPE) com cartucho C_{18} e tampão borato, como descrito por FREIRE et al., (2005). Para o preparo do tampão borato, foram dissolvidos 12,37 g de ácido bórico e 14,91 g de KCl em 1000 mL de água Milli-Q. Em seguida, 50 mL desta solução foram transferidos para um balão de 200 mL juntamente com 20 mL de NaOH 0,2M. Esta mistura foi homogeneizada e seu pH ajustado para 9,0. Uma vez pronto, foi iniciada a SPE, com condicionamento de cartucho SPC C_{18} com 2 mL de metanol e 1 mL de água Milli-Q, em vazão de 2 mL/min. A amostra de soro (500 µL) do animal do grupo DZxELI foi misturada com 10 µL do PI (100µL/mL) e 3 mL do tampão borato, e então foi passada pelo cartucho. O cartucho foi lavado com 3 mL deste mesmo tampão, 4 mL de água Milli-Q e 1 mL de ACN. Após a coluna estar seca, os analitos foram eluídos com 3 mL de n-hexano:metanol (90:10 v/v). Da fase orgânica resultante, 2 mL foram recolhidos e evaporados a 40°C e ressuspendidos com 400 µL da FM com tampão fosfato para posterior injeção no HPLC. Entretanto, os interferentes permaneceram, prejudicando a quantificação do BZ e DZ (Figura 3.3).

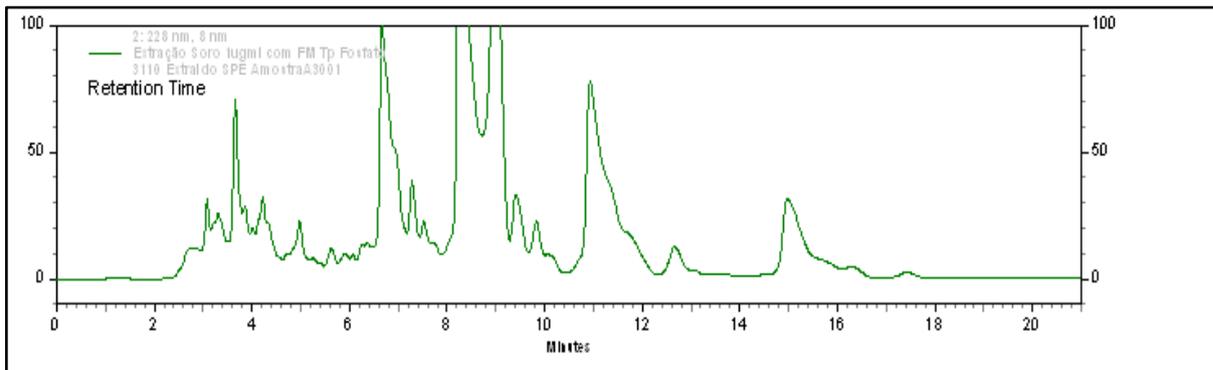


Figura 3.3 - Cromatograma de soro de coelho do grupo DZxELI coletado no momento T1, enriquecido com PI e extraído em coluna de SPE, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 40 ACN : 40 MEOH : 20 TF a um fluxo de 1,0 mL/min. Presença de vários interferentes impedindo a adequada avaliação dos picos do PI e DZ.

Uma metodologia de extração líquido-líquida foi então testada. Para o preparo da amostra, a quantidade de emulsão lipídica que os coelhos utilizados teriam em 500 μ L de plasma após a administração da ELI foi estimada. Os animais receberam um total de 9 mL/kg de ELI, e os coelhos tem aproximadamente 80 a 100 mL de sangue por quilo de peso vivo. Cada 100 mL de sangue resulta em aproximadamente 48 a 60 mL de soro. Desta forma, 9 mL de ELI foi administrado em 60 mL de soro, e em cada 500 μ L de soro havia 75 μ L da emulsão gordurosa. Desta forma, soro (500 μ L) enriquecido com 25 μ L da solução trabalho do PI, 250 μ L da solução trabalho do DZ e 75 μ L de Lipovenos[®] MCT 20% foram misturados em um tubo de ensaio com 1,5 mL de HCl (0,1M), 0,2 g de NaCl e 0,8 g de MgSO₂ e agitados em vórtex por 1 minuto. Em seguida, foi centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos. A fase aquosa foi separada e misturada com 650 μ L de NaOH (0,5 M). Essa fase aquosa foi filtrada em cartuchos de SPE C8, sendo os cartuchos lavados três vezes com 1 mL de água contendo 5% de metanol. Após a lavagem, os cartuchos foram eluídos com mistura de 95% de n-Hexano e 5% de ACN. O eluato foi recolhido e evaporado sob fluxo de ar. Ao sedimento, foi adicionado 300 μ L de FM para ressuspensão, e procedeu-se a filtração e injeção no HPLC. Durante a avaliação, porém, não foram observados os picos do DZ e do PI. Desta forma, conclui-se que esta extração não foi efetiva (Figura 3.4).

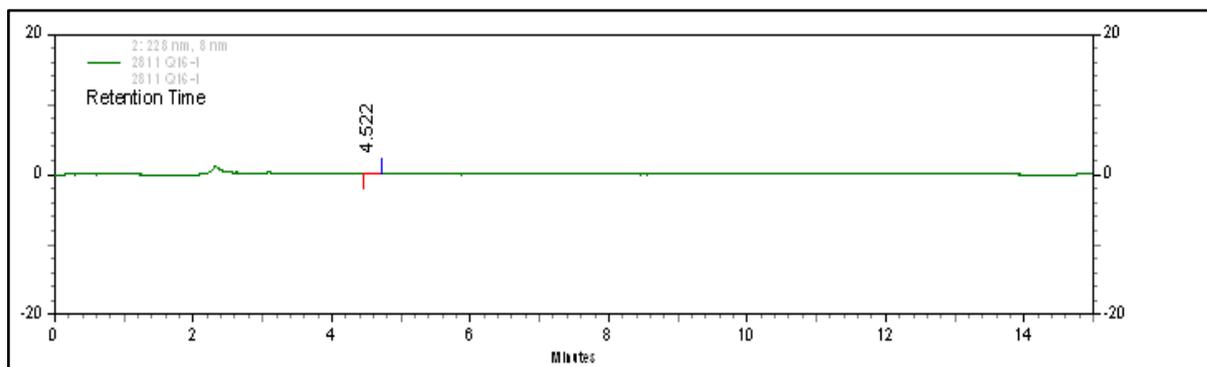


Figura 3.4 - Cromatograma de soro de coelho enriquecido com PI, DZ e ELI, submetido à extração líquido-líquido em coluna de SPE, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 40 ACN : 40 MEOH : 20 TF a um fluxo de 1,0 mL/min. Os picos referentes ao PI e ao DZ não foram observados.

Optou-se por testar uma adaptação do método de QuEChERS descrito anteriormente na extração de benzodiazepínicos de líquidos biológicos (WESTLAND; DORMAN, 2013). As amostras de soro (500 μ L) foram enriquecidas com 75 μ L de emulsão lipídica, 50 μ L da solução trabalho do PI e 250 μ L da solução trabalho de DZ, e agitadas em vórtex durante 1 minuto. Foram adicionados 2 mL de ACN e, novamente, realizada agitação em vórtex por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 0,8 g de $MgSO_4$ anidro e 0,2 g de NaCl e agitado por 1 minuto em vórtex. O $MgSO_4$ atua se ligando a grande quantidade de água, enquanto o NaCl separa as fases ao aumentar a força iônica da fase aquosa (WESTLAND; DORMAN, 2013). Então, a amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi separado (aproximadamente 1,7 mL) e evaporado no concentrador. Após a evaporação de todo o líquido da amostra, ela foi ressuspensa em 500 μ L de FM (40 ACN : 40 MEOH : 20 H_2O) e agitada por 1 minuto em vórtex. Todo o volume foi transferido para um eppendorf com 150 mg de $MgSO_4$, 25 mg de PSA e 25 mg de C_{18} e agitado em vórtex durante 30 segundos. Esta fase atua como um *clean up*, auxiliando na remoção de mais água e de interferentes da matriz (WESTLAND; DORMAN, 2013). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado, transferido para um *vial* e injetado no HPLC. Enquanto o DZ apresentou pico adequado, o pico do PI ficou perto de algumas interferências. O processo foi, então, repetido com uma nova amostra, porém a FM utilizada, inclusive na ressuspensão, foi constituída de 30 ACN: 30 de MEOH : 40 TF. Nestas condições, o BZ apresentou pico em 5,49 minutos e DZ em 12,03 minutos, ambos sem interferentes próximos (Figura 3.5). Uma amostra de soro branco também foi submetida ao QuEChERS modificado, sem observação de picos nos tempos de retenção do PI e DZ, demonstrando a seletividade do método.

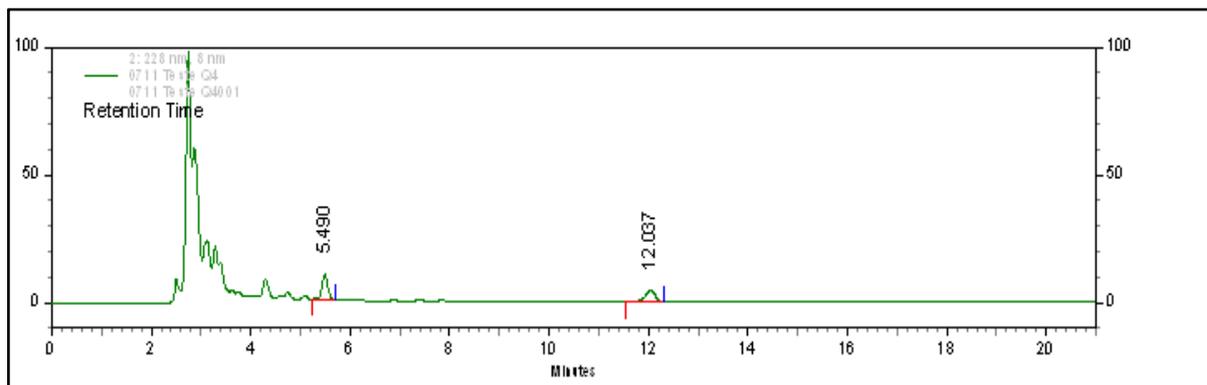


Figura 3.5 - Cromatograma de soro de coelho enriquecido com PI, DZ e ELI, extraído por QuEChERS adaptado, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 30 ACN : 30 MEOH : 40 TF a um fluxo de 1,0 mL/min. O PI apresentou tempo de retenção em 5,49 minutos, e o DZ em 12,03 minutos.

O fluxo foi aumentado de 1 mL/min para 1,2 mL/min para tentar reduzir o tempo de corrida de cada amostra, e os tempos dos picos de BZ e DZ foram, respectivamente, 4,5 minutos e 10 minutos. Os resultados obtidos foram considerados promissores, e a extração por QuEChERS adaptado foi então repetida com 3 concentrações diferentes de DZ (1000 ng/mL, 500 ng/mL e 100 ng/mL), todos com resultados adequados.

Foram realizados novos testes de extração por QuEChERS, comparando o efeito da utilização de MgSO₄ e NaCl, e a extração sem estes sais. O pico de DZ foi mais intenso na amostra extraída sem os sais, então estas etapas foram retiradas da metodologia.

3.3.4.3 LINEARIDADE E REPETIBILIDADE DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUECHERS

Uma curva de concentração de DZ foi então realizada, para testar se havia linearidade nos resultados obtidos. Em cada tubo, além de 50 µL da solução trabalho do PI, foi acrescida solução trabalho de DZ em volumes necessários para a obtenção das seguintes concentrações:

- 0,1 µg/mL (25 µL da solução trabalho em 500 µL de soro).
- 0,20 µg/mL (50 µL da solução trabalho em 500 µL de soro).
- 0,50 µg/mL (125 µL da solução trabalho em 500 µL de soro).
- 0,8 µg/mL (200 µL da solução trabalho em 500 µL de soro).
- 1,0 µg/mL (250 µL da solução trabalho em 500 µL de soro).

Para que não houvesse interferência dos diferentes volumes da solução de DZ, após a adição de 50 μL de BZ em cada tubo, as amostras foram evaporadas no concentrador, e ressuspendidas em 500 μL de soro branco. Emulsão lipídica (75 μL de Lipovenos[®] MCT 20%) foi misturada a cada amostra, e após agitação em vórtex por 1 minuto, elas foram submetidas ao QuEChERS adaptado descrito anteriormente (Figura 3.6) e analisadas. Adequada linearidade foi observada.

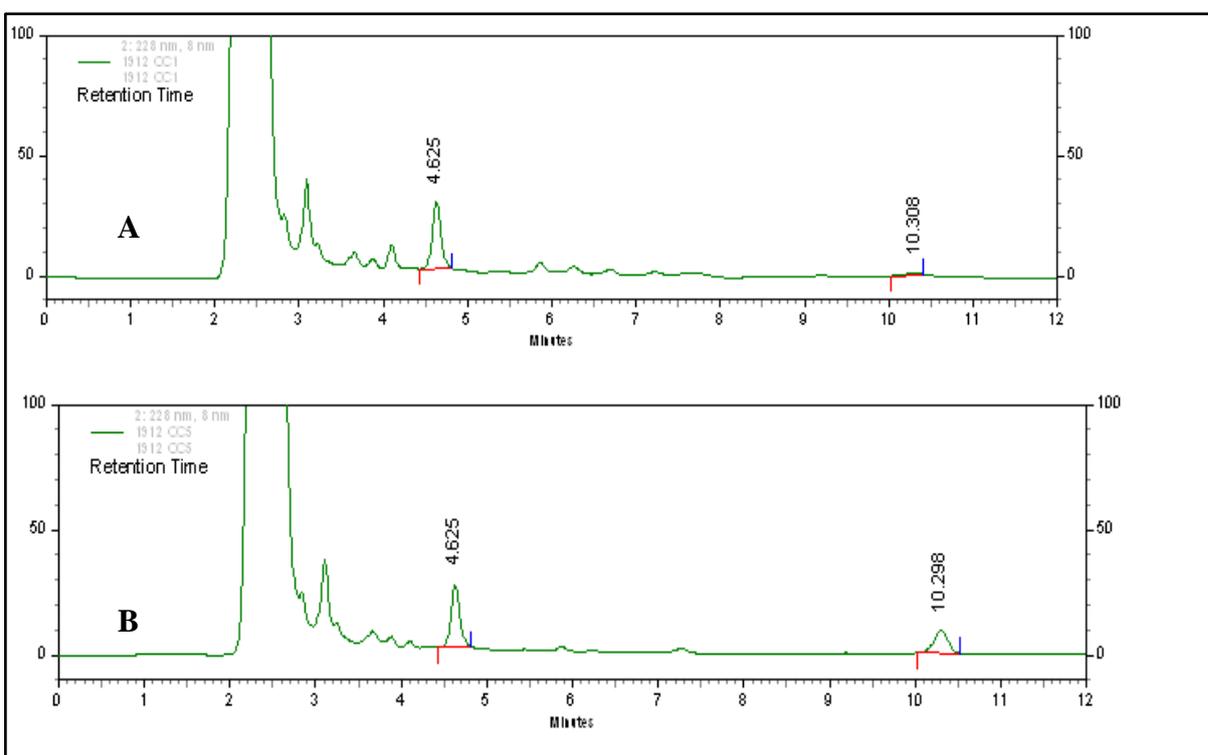


Figura 3.6 - Cromatogramas de soro de coelho enriquecido com PI, DZ e ELI, extraído por QuEChERS adaptado, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 30 ACN : 30 MEOH : 40 TF a um fluxo de 1,0 mL/min. O PI apresentou tempo de retenção em 4,62 minutos, e o DZ em 10,30 minutos. Não foram observados interferentes que prejudicariam a avaliação dos picos do PI e DZ. A: DZ na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$. B: DZ na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$.

Em seguida, foi necessário verificar a repetibilidade desta metodologia, então foram preparadas amostras com DZ em três concentrações diferentes: concentração baixa (100 ng/mL), concentração média (500 ng/mL) e concentração alta (1000 ng/mL) de DZ. Para cada concentração, seis repetições foram realizadas, totalizando 18 amostras. Houve repetibilidade, e a metodologia foi considerada adequada para as extrações com as amostras reais (coletadas de coelhos tratados com ELI durante os experimentos).

3.3.4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE COELHOS TRATADOS COM ELI

Inicialmente, foi realizada extração com amostras de um animal do grupo DZ (capítulo 2) e um do grupo DZxELI (tempos T1 e T2). Para tal, foi acrescido às amostras 50 μ L de solução trabalho de PI, e então submetidas ao QuEChERS modificado. A amostra do grupo DZ não apresentou grandes interferências, assim como o tempo T1 da amostra do grupo DZxELI. Por outro lado, nos tempos T2 a T5 do grupo DZxELI foram observados vários picos interferentes que impediam a avaliação do DZ e do PI (Figura 3.7). Duas amostras do grupo ELI (tempo T2 e T3) também foram extraídas e injetadas, acrescidas de DZ e PI, porém vários picos interferiram nas leituras destes padrões (Figura 3.8).

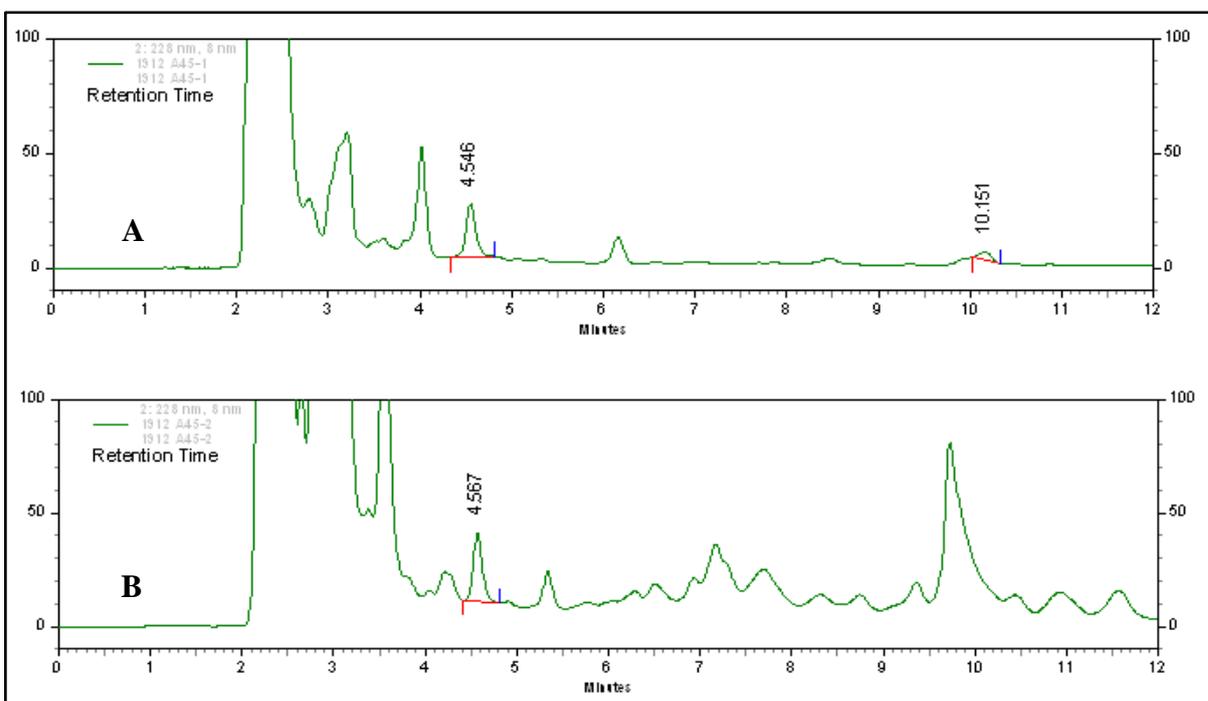


Figura 3.7 - Cromatogramas de soro de coelho do grupo DZxELI enriquecido com PI, extraído por QuEChERS adaptado, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 30 ACN : 30 MEOH : 40 TF a um fluxo de 1,2 mL/min. A: Amostra coletada em T1, após a administração de DZ, porém o animal ainda não havia recebido ELI. É possível observar os picos de PI em 4,5 minutos e o de DZ em 10,1 minutos. B: Amostra coletada em T2, logo após o término da infusão de ELI. É possível observar a presença de vários interferentes que impedem a adequada avaliação do pico de DZ.

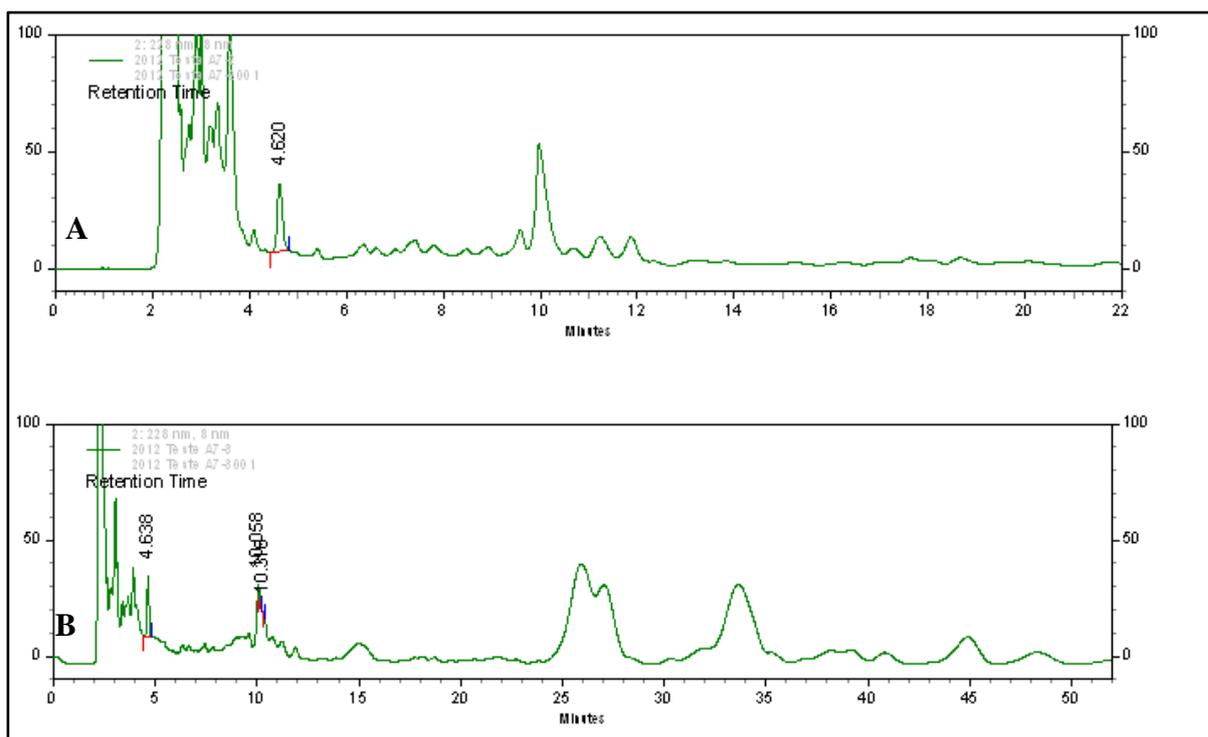


Figura 3.8 - Cromatogramas de soro de coelho do grupo ELI enriquecido com PI, extraído por QuEChERS adaptado, em coluna Shim-pack BE-006 CLC-ODS (M) e fase móvel 30 ACN : 30 MEOH : 40 TF a um fluxo de 1,2 mL/min. A: Amostra coletada em T2, com tempo de corrida de 22 minutos, com diversos interferentes próximos aos tempos referentes aos picos do PI e do DZ. B: Amostra coletada em T3, com tempo de corrida estendido para 50 minutos. Até 50 minutos de corrida ainda é possível observar a presença de interferentes.

Uma vez que os picos interferentes foram observados somente nas amostras de animais e tempos que receberam ELI, eles são possivelmente oriundos de produtos da metabolização ou degradação da emulsão. Possivelmente a ELI que os coelhos receberam impediu a adequada detecção e quantificação do DZ no plasma.

As técnicas de pré-tratamento de amostras de plasma com DZ já estabelecidas anteriormente não foram adequadas para as amostras com emulsão lipídica. Possíveis interferências causadas pela matriz são comuns na avaliação cromatográfica (WESTLAND; DORMAN, 2013). PAPADOPOULOU et al. (2012) cita que para a detecção de fármacos frente à lipemia são necessárias técnicas especiais, que nem sempre são acessíveis. Neste caso, por exemplo, é possível que a associação de um espectrômetro de massas à HPLC possibilite a detecção e quantificação. BRANCO (2015) obteve sucesso na detecção de ivermectina em amostras de coelhos medicados com ELI (Lipovenos[®] LCT 20%) ao utilizar HPLC e espectrômetro de massa. JOHNSON-ARBOR, SALINGER e LUCZYCKI (2015) relatam a

possibilidade de quantificação de propranolol em paciente tratado com ELI 20% após ultracentrifugação da amostra lipêmica e leitura por HPLC e espectrômetro de massa.

Também foi possível observar que no tempo T1 das amostras do grupo DZ e DZxELI, ou seja, amostras sem emulsão gordurosa, foi possível observar o pico de DZ, porém este apresentava intensidade muito baixa. Para as doses administradas, sugere-se também que a HPLC-UV não foi sensível o suficiente para esta detecção, e aparelhos mais sensíveis são necessários.

3.4 CONCLUSÕES

A infusão de ELI (Lipovenos[®] MCT 20%) em coelhos interferiu na avaliação da concentração sérica de PT, albumina, ureia, creatinina, colesterol e hemoglobina, e da atividade enzimática da AST, ALT, FA, GGT, e da amilase. Desta forma, a importância destes exames na monitoração e no tratamento dos pacientes deve ser levada em consideração durante a decisão de utilização, ou não, da ELI. A diluição das amostras não resultou, na maioria das análises, em resolução da interferência gerada pela lipemia. O tratamento com a ELI também impediu a determinação cromatográfica do DZ com procedimentos descritos anteriormente como adequados. A busca por métodos que possam resultar em adequada purificação desta matriz e eficiente quantificação do benzodiazepínico é estimulada. Nos casos em que estas análises são essenciais em pacientes que serão tratados com ELI, como para diagnóstico definitivo de exposição ao fármaco, sugere-se coleta da amostra antes da administração da ELI.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos sugerem que o protocolo utilizado de tratamento com ELI 20% (solução com MCT e LCT) pode ser administrado concomitantemente ao DZ com segurança, sem interferir na ação deste fármaco. Entretanto, é possível que na presença de doses mais altas de DZ, a ELI altere a concentração e o efeito deste fármaco, assim como é possível que a resposta varie com a utilização de diferentes formulações de ELI. O desenvolvimento do experimento em animais que não estavam intoxicados foi uma limitação deste estudo, uma vez que a segurança observada pode ser alterada em pacientes com diferentes condições clínicas. O fato de não ter sido possível quantificar o DZ sanguíneo também foi um fator limitador, prejudicando a avaliação da ação da ELI sobre esse benzodiazepínico. Estudos posteriores são encorajados, com especial atenção para a avaliação quantitativa de variações na concentração sanguínea e tecidual do DZ quando associado à terapia com ELI, e frente a diferentes concentrações desse fármaco.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, A. et al. Effect of Diazepam on Severity of Acute Pancreatitis: Possible Involvement of Peripheral Benzodiazepine Receptors. **ISRN Gastroenterology**, v. 2013, n. 484128, 2013.
- ACIKGÖZ, A. et al. Two compartment model of diazepam biotransformation in an organotypical culture of primary human hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 234, n. 2, p. 179–191, 2009.
- ANDRADE, N. N. N.; OLIVEIRA, M. V; SOUZA, C. L. Procedures to minimize interference of hypertriglyceridemia in laboratory exams of lipemic samples in acute pancreatitis: a case report. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, n. 2, p. 103–106, 2016.
- ARDIACA, M.; BONVEHÍ, C.; MOSTESINOS, A. Point of Care Blood Gas and Electrolyte Analysis in Rabbits. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 175–195, 2013.
- ARENDT, R. M. et al. In Vitro Correlates of Benzodiazepine Cerebrospinal Fluid Uptake, Pharmacodynamic Action and Peripheral Distribution. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 227, n. 1, p. 98–106, 1983.
- BAKER, A. J. et al. Hypothermia Prevents Ischemia-Induced Increases in Hippocampal Glycine Concentrations in Rabbits. **Stroke**, v. 22, n. 5, p. 666–673, 1991.
- BARGEN-LOCKNER, C. et al. Effect of Intralipid on Total and High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Newborns and Infants. **Biology of the Neonate**, v. 44, n. 5, p. 272–277, 1983.
- BARSON, A. J.; CHISWICK, M. L.; DOIG, C. M. Fat embolism in infancy after intravenous fat infusions. **Archives of Disease in Childhood**, v. 53, n. 3, p. 218–223, 1978.
- BARZAGO, M. M. et al. Monitoring of blood gas parameters and acid-base balance of pregnant and non-pregnant rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in routine experimental conditions. **Laboratory Animals**, v. 26, n. 2, p. 73–79, 1992.
- BATEMAN, S. W. Making sense of blood gas results. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 3, p. 543–557, 2008.
- BATES, N. et al. Lipid infusion in the management of poisoning: A report of 6 canine cases. **Veterinary Record**, v. 172, n. 13, p. 339, 2013.
- BEAULIEU, L. M. et al. Platelet functional and transcriptional changes induced by intralipid infusion. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 115, n. 6, p. 1147–1156, 2016.
- BECKER, M. D.; YOUNG, B. C. Treatment of severe lipophilic intoxications with intravenous lipid emulsion: a case series (2011 - 2014). **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 8, p. 77–85, 2017.
- BEDOCS, P. et al. Hypersensitivity reactions to intravenous emulsion in swine: relevance for lipid resuscitation studies. **Anesthesia & Analgesia**, v. 119, n. 5, p. 1094–1101, 2014.
- BENSON, K. G.; PAUL-MURPHY, J. Clinical pathology of the domestic rabbit - acquisition and interpretation of samples. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 2, n. 3, p. 539–551, 1999.
- BOOTHE, D. M. Anticonvulsant therapy in small animals. **Veterinary Clinics of North**

America: Small Animal Practice, v. 28, n. 2, p. 411–448, 1998.

BORNHORST, J. A.; ROBERTS, R. F.; ROBERTS, W. L. Assay-specific differences in lipemic interference in native and Intralipid-supplemented samples. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2197–2201, 2004.

BRADSHAW, E. G.; PLEUVRY, B. J. Respiratory and hypnotic effects of nitrazepam, diazepam and pentobarbitone and their solvents in the rabbit and the mouse. **British Journal of Anaesthesia**, v. 43, n. 7, p. 637–643, 1971.

BRANCO, S. E. M. T. **Emulsão Lipídica no Tratamento de Coelho Nova Zelândia Intoxicados pela Ivermectina**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 62p.. 2015.

BROCK, LORD; SKINNER, J. M.; MANDERS, J. T. Observations on peripheral and central temperatures with particular reference to the occurrence of vasoconstriction. **The British Journal of Surgery**, v. 62, n. 8, p. 589–595, 1975.

BÜLOW, J.; MADSEN, J.; HØJGAARD, L. Reversibility of the effects on local circulation of high lipid concentrations in blood. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 50, n. 3, p. 291–296, 1990.

CALCATERRA, N. E.; BARROW, J. C. Classics in chemical neuroscience: Diazepam (Valium). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 253–260, 2014.

CAMPBELL, T. W. Hematologia de mamíferos: animais de laboratório e espécies variadas. In: THRALL, M. A. (Ed.). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Primeira E ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 201–206.

CAO, D. et al. Intravenous lipid emulsion in the emergency department: a systematic review of recent literature. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 48, n. 3, p. 387–397, 2015.

CARPENTIER, Y. A. Intravascular metabolism of fat emulsions: the Arvid Wretlind Lecture, Espen 1988. **Clinical Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 115–125, 1989.

CARPENTIER, Y. A.; DUPONT, I. E. Advances in intravenous lipid emulsions. **World Journal of Surgery**, v. 24, n. 12, p. 1493–1497, 2000.

CASTRO, C. Y. ARDS and Diffuse alveolar damage: A pathologist's perspective. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 18, n. 1, p. 13–19, 2006.

CAVE, G.; HARVEY, M. G. Should we consider the infusion of lipid emulsion in the resuscitation of poisoned patients ? **Critical Care**, v. 18, n. 5, p. 457, 2014.

CHEN, H.; ALBERTSON, T. E.; OLSON, K. R. Treatment of drug-induced seizures. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 412–419, 2015.

CHENERY, R. J. et al. Diazepam metabolism in cultured hepatocytes from rat, rabbit, dog, guinea pig, and man. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 15, n. 3, p. 312–317, 1987.

COLOMB, V. et al. Role of lipid emulsion in cholestasis associated with long-term parenteral nutrition in children. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 345–350, 2015.

CRANDELL, D. E.; WEINBERG, G. L. Moxidectin toxicosis in a puppy successfully treated with intravenous lipids. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 2, p.

181–186, 2009.

CRESTANI, F. et al. Molecular targets for the myorelaxant action of Diazepam. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 442–445, 2001.

CROOK, M. A. Lipid clearance and total parenteral nutrition: the importance of monitoring plasma lipids. **Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 774–775, 2000.

CURY-BOAVENTURA, M. F. et al. Toxicity of a soybean oil emulsion on human lymphocytes and neutrophils. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 115–123, 2006.

DAVIS, S. S. et al. The effect of infused fat emulsions on reticuloendothelial function in the rabbit. **Clinical Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 260–265, 1990.

DAY, T. K. Blood gas analysis. **The Veterinary Clinics - Small Animal Practice**, v. 32, n. 5, p. 1031–1048, 2002.

DECUBELLIS, J. Common emergencies in rabbits, guinea pigs, and chinchillas. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 19, n. 2, p. 411–429, 2016.

DEGROOT, W. D. Intravenous lipid emulsion for treating permethrin toxicosis in a cat. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 55, n. 2, p. 1253–1254, 2016.

DIMESKI, G. A commentary on the effect of lipid emulsions on pathology tests. **Journal of the Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland**, v. 64, n. 9, p. 1033–1035, 2009.

DONNELLY, T. M. Basic anatomy, physiology and husbandry. In: HILLYER, E. V; QUESENBERRY, K. E. (Eds.). **Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery**. First ed. Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1997. p. 148.

DRISCOLL, D. F. Lipid injectable emulsions: pharmacopeial and safety issues. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 9, p. 1959–1969, 2006.

DUREAU, P. et al. Effect of Intralipid on the dose of Ropivacaine or Levobupivacaine tolerated by volunteers: a clinical and pharmacokinetic study. **Anesthesiology**, v. 125, n. 3, p. 474–483, 2016.

EATWELL, K. et al. Use of arterial blood gas analysis as a superior method for evaluating respiratory function in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinary Record**, v. 173, n. 7, p. 166, 2013.

EDWARDS, P.; SHIHAB, N.; SCOTT, H. W. Treatment of a case of feline baclofen toxicosis with intravenous lipid therapy. **Veterinary Record Case Reports**, v. 2, n. 1, p. 1–3, 2014.

FERNANDEZ, A. L. et al. The use of intravenous lipid emulsion as an antidote in veterinary toxicology. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 21, n. 4, p. 309–320, 2011.

FETTIPLACE, M. R. et al. Rapid cardiostimulant effects of lipid emulsion infusion. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 8, p. 156–162, 2013.

FETTIPLACE, M. R. et al. Resuscitation with lipid emulsion - dose-dependent recovery from cardiac pharmacotoxicity requires cardiostimulant effect. **Anesthesiology**, v. 120, n. 4, p. 915–925, 2014.

- FETTIPLACE, M. R. et al. Multi-modal contributions to detoxification of acute pharmacotoxicity by a triglyceride micro-emulsion. **Journal of Controlled Release**, n. 198, p. 62–70, 2015.
- FETTIPLACE, M. R.; WEINBERG, G. The mechanisms underlying lipid resuscitation therapy. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 43, n. 2, p. 138–149, 2018.
- FLAHERTY, D. Anaesthetic Drugs. In: WELSH, L. (Ed.). . **Anaesthesia for Veterinary Nurses**. Second ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. p. 121–162.
- FREIRE, E. F. et al. Diazepam e Nordiazepam em plasma: métodos de extração líquido-líquido e em fase sólida no pré-tratamento de amostras para análise cromatográfica em fase líquida. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 773–776, 2005.
- FRIEDMAN, H. et al. Tissue distribution of Diazepam metabolite desmethyldiazepam: a human autopsy study. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 8, p. 613–615, 1985.
- GAUDREAU, P. et al. Benzodiazepine poisoning: clinical and pharmacological considerations and treatment. **Drug Safety**, v. 6, n. 4, p. 247–265, 1991.
- GHATAK, T.; SAMANTA, S.; BARONIA, A. K. Anaphylactic shock with intravenous 20% lipid emulsion in a young patient: Should we ask about soybean allergy beforehand? **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 8, n. 2, p. 143–144, 2014.
- GIBSON, J. C. et al. Haematological and biochemical abnormalities associated with Intralipid hyperalimentation. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 6, n. 4, p. 350–354, 1978.
- GOLDENBERG, A. et al. Experimental model of severe acute pancreatitis in rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, n. 5, p. 366–371, 2007.
- GOSMANOV, A. R. et al. Vascular effects of intravenous intralipid and dextrose infusions in obese subjects. **Metabolism**, v. 61, n. 10, p. 1370–1376, 2012.
- GOSELIN, S. et al. Evidence-based recommendations on the use of intravenous lipid emulsion therapy in poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 54, n. 10, p. 899–923, 2016.
- GREENBLATT, D. J. et al. Benzodiazepine kinetics: implications for therapeutics and pharmacogeriatrics. **Drug Metabolism Reviews**, v. 14, n. 2, p. 251–292, 1983.
- GREGORIO, G. DI et al. Lipid emulsion is superior to vasopressin in a rodent model of resuscitation from toxin-induced cardiac arrest. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 3, p. 993–999, 2009.
- GRUNBAUM, A. M. et al. Analytical interferences resulting from intravenous lipid emulsion. **Clinical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 812–817, 2012.
- GUIGNARD, J. P. et al. Effect of intravenous diazepam on renal function. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, n. 4, p. 401–404, 1975.
- GWALTNEY-BRANT, S.; MEADOWS, I. Use of intravenous lipid emulsions for treating certain poisoning cases in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 2, p. 251–262, 2012.
- GWALTNEY-BRANT, S.; MEADOWS, I. Intravenous lipid emulsions in veterinary clinical toxicology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 933–942, 2018.

- HARCOURT-BROWN, F. M. Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 13, n. 2, p. 86–93, 2004.
- HARCOURT-BROWN, F. M.; HARCOURT-BROWN, S. Clinical value of blood glucose measurement in pet rabbits. **Veterinary Record**, v. 170, n. 26, p. 674, 2012.
- HARVEY, M.; CAVE, G.; ONG, B. Intravenous lipid emulsion-augmented plasma exchange in a rabbit model of clomipramine toxicity ; survival , but no sink. **Clinical Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 13–19, 2014.
- HARVEY, M. G.; CAVE, G. R. Intralipid infusion ameliorates Propranolol-induced hypotension in rabbits. **Journal of Medical Toxicology**, v. 4, n. 2, p. 71–76, 2008.
- HAYES, B. D. et al. Systematic review of clinical adverse events reported after acute intravenous lipid emulsion administration. **Clinical Toxicology**, v. 54, n. 5, p. 365–404, 2016.
- HEIN, J.; HARTMANN, K. Labordiagnostische referenzbereiche bei kaninchen. **Tierärztliche Praxis**, v. 31, n. 05, p. 321–328, 2003.
- HERSON, V. C. et al. Effects of Intraveous fat infusion on neonatal neutrophil and platelet function. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 13, n. 6, p. 620–622, 1989.
- HILLER, D. B. et al. Safety of high volume lipid emulsion infusion - a first approximation of LD50 in rats. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 35, n. 2, p. 140–144, 2010.
- HIPPALGAONKAR, K.; MAJUMDAR, S.; KANSARA, V. Injectable lipid emulsions - advancements, opportunities and challenges. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 11, n. 4, p. 1526–1540, 2010.
- HOFFMAN, W. E.; SOLTER, P. F. Diagnostic enzymology of domestic animal. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.). . **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Sixth ed. Massachusetts: Academic Press, 2008. p. 366–367.
- HOJER, J. et al. Lipid rescue – efficacy and safety still unproven. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 119, n. 4, p. 1–4, 2016.
- HULTIN, M. et al. Intravenous lipid emulsions: removal mechanisms as compared to chylomicrons. **Journal of Lipid Research**, v. 36, n. 10, p. 2174–2184, 1995.
- HUPFELD, C. Lactate concentration in blood of healthy and ill rabbits. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere**, v. 37, n. 4, p. 244–249, 2009.
- IGARI, Y. et al. Tissue distribution of ¹⁴C-Diazepam and its metabolites in rats. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 10, n. 6, p. 676–679, 1982.
- IGARI, Y. et al. Prediction of iazepam disposition in the rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 11, n. 6, p. 577–593, 1983.
- ILLUM, L. et al. The effect of stabilising agents on the organ distribution of lipid emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 54, n. 1, p. 41–49, 1989.
- IQBAL, U.; ANWAR, H.; SCRIBANI, M. Ringer’s Lactate vs Normal Saline in acute pancreatitis: a systematic review and meta- analysis. **Journal of Digestive Disease**, v. 19, n. 6, p. 335–341, 2018.
- JABEN, E. A.; KOCH, C. D.; KARON, B. S. Lipid emulsion solution: A novel cause of

- hemolysis in serum and plasma blood samples. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 2–3, p. 254–256, 2011.
- JENKINS, J. R. Rabbit diagnostic testing. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 17, n. 1, p. 4–15, 2008.
- JEPPSSON, R. I. Plasma levels of diazepam in the dog and the rabbit after two different injection formulations, emulsion and solution. **Journal of Clinical Pharmacy**, v. 1, n. 4, p. 181–187, 1976.
- JEPPSSON, R.; RÖSSNER, S. The influence of emulsifying agents and of lipid soluble drugs on the fractional removal rate of lipid emulsions from the blood stream of the rabbit. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 37, n. 2, p. 134–144, 1975.
- JOHNSON-ARBOR, K.; SALINGER, L.; LUCZYCKI, S. Prolonged laboratory interference after administration of intravenous lipid emulsion therapy. **Journal of Medical Toxicology**, v. 11, n. 2, p. 223–226, 2015.
- JOHNSON, R. C. et al. Medium-chain-triglyceride lipid emulsion: metabolism and tissue distribution. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 502–508, 1990.
- JOMMI, G.; MANITTO, P.; SILANOS, M. A. Metabolism of Diazepam in rabbits. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 108, n. 3, p. 562–568, 1964.
- KAUR, P.; KIM, K. Pharmacokinetics and brain uptake of diazepam after intravenous and intranasal administration in rats and rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 1, p. 27–35, 2008.
- KAZEMI, A. et al. The effect of lipid emulsion on depth of anaesthesia following thiopental administration to rabbits. **Journal of the Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland**, v. 66, n. 5, p. 373–378, 2011.
- KEEBLE, E. Common neurological and musculoskeletal problems. **In Practice**, v. 28, n. 4, p. 212–218, 2006.
- KESSLER, U. et al. Effects of Intralipid infusion on hemorheology and peripheral resistance in neonates and children. **Pediatric Surgery International**, v. 21, n. 3, p. 197–202, 2005.
- KHOLOUSSY, A. M. et al. Central peripheral temperature gradient - its value and limitations in the management of critically ill surgical patients. **The American Journal of Surgery**, v. 140, n. 5, p. 609–612, 1980.
- KHORZAD, R. et al. Baclofen toxicosis in dogs and cats: 145 cases (2004–2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 241, n. 8, p. 1059–1064, 2012.
- KISS, L. et al. The effect of serum triglyceride concentration on the outcome of acute pancreatitis: systematic review and meta-analysis. **Nature**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
- KLOTZ, H.; ANTONIN, K. H.; BIECK, P. R. Pharmacokinetics and plasma binding of Diazepam in man, dog, rabbit, guinea pig and rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 199, n. 1, p. 67–73, 1976.
- KROLL, M. H.; ELIN, R. J. Interference with clinical laboratory analyses. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 1996–2005, 1994.
- KUO, K.; ODUNAYO, A. Adjunctive therapy with intravenous lipid emulsion and methocarbamol for permethrin toxicity in 2 cats. **Journal of Veterinary Emergency and**

Critical Care, v. 23, n. 4, p. 436–441, 2013.

LANGLOIS, I. et al. Blood concentrations of d- and l-lactate in healthy rabbits. **Journal of Small Animal Practice**, v. 55, n. 9, p. 451–456, 2014.

LEE, R. C. The rectal temperature of the normal rabbit. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 125, n. 3, p. 521–529, 1939.

LESKIW, U.; WEINBERG, G. L. Lipid resuscitation for local anesthetic toxicity: is it really lifesaving? **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 22, n. 5, p. 667–671, 2009.

LEVINE, M. et al. Delayed-onset seizure and cardiac arrest after Amitriptyline overdose, treated with intravenous lipid emulsion therapy. **Pediatrics**, v. 130, n. 2, p. e432-438, 2012.

LEVINE, M. et al. Complications Following Antidotal Use of Intravenous Lipid Emulsion Therapy. **Journal of Medical Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 10–14, 2014.

LEVINE, M. et al. Systematic review of the effect of intravenous lipid emulsion therapy for non-local anesthetics toxicity. **Clinical Toxicology**, v. 54, n. 3, p. 194–221, 2016.

LIANG, C.-S.; YANG, F.-E.; HO, P.-S. Intravenous lipid emulsion-associated catatonia, thrombocytopenia, and leukopenia: a case report and the role of NMDA receptor. **Psychosomatics**, v. 53, n. 2, p. 193–195, 2012.

LIPSON, A. H.; PRITCHARD, J.; THOMAS, G. Thrombocytopenia after intralipid infusion in a neonate. **The Lancet**, v. 2, n. 7894, p. 1462–1463, 1974.

LITONIUS, E. et al. Effect of intravenous lipid emulsion on bupivacaine plasma concentration in humans. **Anaesthesia**, v. 67, n. 6, p. 600–605, 2012.

LITZ, R. J. et al. Reversal of central nervous system and cardiac toxicity after local anesthetic intoxication by lipid emulsion injection. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 5, p. 1575–1577, 2008.

LUZI, F. et al. Evaluation of skin temperature change as stress indicator in rabbit through infrared thermography. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 1, p. 769, 2007.

LYON, A. W.; BASKIN, L. B. Pseudohyponatremia in a myeloma patient: direct electrode potentiometry is a method worth its salt. **Laboratory Medicine**, v. 34, n. 5, p. 357–360, 2003.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 12, p. 457–462, 1996.

MANCINELLI, E. Neurologic examination and diagnostic testing in rabbits, ferrets, and rodents. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 24, n. 1, p. 52–64, 2015.

MANDELLI, M.; TOGNONI, G.; GARATTINI, S. Clinical pharmacokinetics of Diazepam. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 3, n. 1, p. 72–91, 1978.

MARCUCCI, F. et al. Levels of Diazepam in adipose tissue of rats, mice and man. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, v. 4, n. 4, p. 464–466, 1968.

MARWICK, P. C.; LEVIN, A. I.; COETZEE, A. R. Recurrence of cardiotoxicity after lipid rescue from Bupivacaine-induced cardiac arrest. **Anesthesia and Analgesia**, v. 108, n. 4, p. 1344–1346, 2009.

MCALLISTER, R. K.; TUTT, C. D.; COLVIN, C. S. Lipid 20% emulsion ameliorates the

symptoms of Olanzapine toxicity in a 4-year-old. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1012.e1–2, 2012.

MCGRATH, K. M. et al. Intralipid induced haemolysis. **British Journal of Haematology**, v. 50, n. 2, p. 376–378, 1982.

MELILLO, A. Rabbit clinical pathology. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 16, n. 3, p. 135–145, 2007.

MERCOLINI, L. et al. Simultaneous analysis of diazepam and its metabolites in rat plasma and brain tissue by HPLC-UV and SPE. **TALANTA**, v. 80, n. 1, p. 279–285, 2009.

MOHAMMED, A. A.; SAYED, M. A. M.; ABDELNABI, M. A. A new protocol of anesthesia using Thiopental, Diazepam and Xylazine in White New Zealand rabbits. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 9, p. 1296–1300, 2011.

MORAIS, K. S. DE. **Avaliação dos gradientes de temperatura em gatos hípidos**. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. Brasília, 42p. 2016.

NATIONAL CENTER FOR THE REPLACEMENT REFINEMENT & REDUCTION OF ANIMALS IN RESEARCH. **NCR3S**. 2018. Blood sampling: general principles. Disponível em: <<https://nc3rs.org.uk/blood-sampling-general-principles>> Acesso em: 11 de dez. de 2019.

NIIYA, T. et al. Intravenous lipid emulsion sequesters Amiodarone in plasma and eliminates its hypotensive action in pigs. **Annals of Emergency Medicine**, v. 56, n. 4, p. 402- 408.e2, 2010.

NIKOLAC, N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 1, p. 57–67, 2014.

OZKAN, C.; KAYA, A.; AKGUL, Y. Normal values of haematological and some biochemical parameters in serum and urine of New Zealand White rabbits. **World Rabbit Science**, v. 20, n. 4, p. 253–259, 2012.

PAES, P. R. DE O.; LEME, F. DE O. P.; CARNEIRO, R. A. **Hematologia dos Animais Domésticos**. Primeira ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009.

PAN, Y. et al. Development of a novel model of hypertriglyceridemic acute pancreatitis in mice. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017.

PANTER-BRICK, M.; WAGGET, J.; DALE, G. Intralipid and thrombocytopenia. **Lancet**, v. 1, n. 7911, p. 857–858, 1975.

PAPADOPOULOU, A. et al. The use of dye surrogates to illustrate local anesthetic drug sequestration by lipid emulsion - a visual demonstration of the lipid sink effect. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 37, n. 2, p. 183–187, 2012.

PEACOCK, R. E. **Intravenous lipid emulsion in the treatment of permethrin toxicosis in cats**. Thesis (Research Masters with training - Veterinary Medical Science), Murdoch University. 111p. 2014.

RAEKALLIO, M. et al. Some factors influencing the level of clinical sedation induced by medetomidine in rabbits. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 1, p. 39–42, 2002.

ROSENBLATT, M. A. et al. Successful use of a 20% lipid emulsion to resuscitate a patient

after a presumed Bupivacaine-related cardiac arrest. **Anesthesiology**, v. 105, n. 1, p. 217–218, 2006.

ROUINI, M.-R. et al. An improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 671–676, 2008.

RUBIN, M. et al. The effect of short-term lipid infusion on liver function and biliary secretion in rats. **Lipids**, v. 27, n. 5, p. 321–325, 1992.

RUSSELL, R. L.; WESTFALL, B. A. Alleviation of barbiturate depression by fat emulsion. **Anesthesia and Analgesia**, v. 41, n. 5, p. 582–585, 1962.

SAROV, G. M.; ILIEVA, G. S. Diazepam Impairs glucose tolerance and increases serum glucose in NZW rabbits. **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, v. 56, n. 11, p. 77–80, 2003.

SHI, K. et al. The effect of lipid emulsion on pharmacokinetics and tissue distribution of bupivacaine in rats. **Anesthesia and Analgesia**, v. 116, n. 4, p. 804–809, 2013.

SNOWDEN, N. J. et al. Clinical presentation and management of moxidectin toxicity in two dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 47, n. 10, p. 620–624, 2006.

STEBBENS, W. E. Microcirculatory changes in rabbit ear chambers following the infusion of fat emulsions. **Metabolism**, v. 16, n. 5, p. 473–481, 1967.

SUCKOW, M. A.; SCHROEDER, V. A. The important biological features. In: SUCKOW, M. A.; SCHROEDER, V. A. (Eds.). . **The Laboratory Rabbit**. Second ed. London: CRC Press, 2012. p. 1–9.

SZNITOWSKA, M. et al. Bioavailability of Diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS**, v. 52, n. 2, p. 159–163, 2001.

TURNER-LAWRENCE, D. E.; KERNS II, W. Intravenous fat emulsion: a potential novel antidote. **Journal of Medical Toxicology**, v. 4, n. 2, p. 109–114, 2008.

UDELSMANN, A.; MELO, M. D. S. Hemodynamic changes with high infusion rates of lipid emulsion. Experimental study in swine. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 720–726, 2015.

VARGA, M. Neurological and locomotor disorders. In: VARGA, M. (Ed.). . **Textbook of Rabbit Medicine**. Second ed. Edinburgh: Butterworth-Heinemann, 2013a. p. 367–389.

VARGA, M. Therapeutics. In: VARGA, M. (Ed.). . **Textbook of Rabbit Medicine**. Second ed. Edinburgh: Butterworth-Heinemann, 2013b. p. 143.

VERNAU, K. M.; OSOFSKY, A.; LECOUTEUR, R. A. The neurological examination and lesion localization in the companion rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 10, n. 3, p. 731–758, 2007.

VILARÓ, S.; LLOBERA, M. Uptake and metabolism of Intralipid by rat liver: an electron-microscopic study. **The Journal of Nutrition**, v. 118, n. 8, p. 932–940, 1988.

WAITZBERG, D. L.; TORRINHAS, R. S.; JACINTHO, T. M. New Parenteral lipid emulsions for clinical use. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 351–367, 2006.

- WEIDMANN, B. et al. Hypersensitivity reactions to parenteral lipid solutions. **Support Care Cancer**, v. 5, n. 6, p. 504–505, 1997.
- WEINBERG, G. et al. Lipid emulsion infusion rescues dogs from Bupivacaine-induced cardiac toxicity. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 28, n. 3, p. 198–202, 2003.
- WEINBERG, G. L. et al. Pretreatment or resuscitation with a lipid infusion shifts the dose-response to bupivacaine-induced asystole in rats. **Anesthesiology**, v. 88, n. 4, p. 1071–1075, 1998.
- WEINBERG, G. L. et al. Lipid Infusion accelerates removal of Bupivacaine and recovery from Bupivacaine toxicity in the isolated rat heart. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 31, n. 4, p. 296–303, 2006.
- WEINBERG, G. L. Lipid emulsion infusion - resuscitation for local anesthetic and other drugs overdose. **Anesthesiology**, v. 117, n. 1, p. 180–187, 2012.
- WESTLAND, J. L.; DORMAN, F. L. QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 6, p. 509–517, 2013.
- YOUNG, A. B.; CHU, D. Distribution of GABA A and GABA B receptors in mammalian brain: potential targets for drug development. **Drug Development Research**, v. 21, n. 3, p. 161–167, 1990.
- ZAMBRANO, E. Z. et al. Total parenteral nutrition induced liver pathology : an autopsy series of 24 newborn cases. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 7, n. 5, p. 425–432, 2004.