

Stephanie Elise Muniz Tavares Branco

**Emulsão Lipídica no Tratamento de Coelhos Nova Zelândia Intoxicados pela Ivermectina**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Área: Medicina e Cirurgia Veterinária. Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília Martins Melo. Coorientador: Prof. Dr. Benito Soto-Blanco.

Belo Horizonte- MG

Escola de Veterinária - UFMG

2015

B816e Branco, Stephanie Elise Muniz Tavares, 1987-  
Emulsão lipídica no tratamento de coelhos Nova Zelândia intoxicados pela ivermectina /  
Stephanie Elise Muniz Tavares Branco. – 2015.  
62p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo

Coorientador: Benito Soto-Blanco

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Coelho – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Avermectinas – Teses. 3. Intoxicação –  
Teses. I. Melo, Marília Martins. II. Soto-Blanco, Benito. III. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.932 208 96

## FOLHA DE APROVAÇÃO

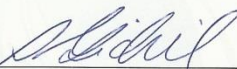
### STEPHANIE ELISE MUNIZ TAVARES BRANCO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

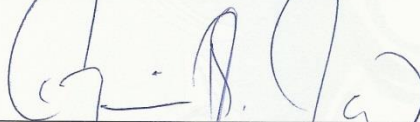
Aprovada em 17 de Dezembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Profª. Marília Martins Melo  
Presidente - Orientador



Profª. Ana Flávia Ribeiro Machado Michel  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Dr. Cláudio Roberto Scabelo Mattoso  
Pós - Doutorado - UFMG



Prof. Bruno Benetti Junta Torres  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE





## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, força imensurável que não permitiu que eu desistisse nos momentos mais difíceis. “O Senhor é meu pastor, e nada me faltará”.

À minha família. Aos meus pais, que sempre apoiaram meus sonhos e me incentivaram a atingir o meu verdadeiro potencial. Pelas palavras de conforto e inspiração durante as muitas madrugadas acordada, e pelas orações quando tive que me ausentar. Às minhas irmãs, o melhor presente que Deus me deu! Com vocês ao meu lado tenho certeza que tudo é possível, e sempre tenho a minha “rede de segurança”. Ninguém me conhece como vocês, e um simples olhar já me conforta. Aos meus sobrinhos, meus anjinhos, pela inspiração a sempre buscar ser a melhor pessoa possível para vocês!

À minha orientadora, Professora Marília. Pela confiança depositada em mim e nas minhas ideias, e por todo o apoio e tranquilidade durante estes dois anos.

Ao Professor Benito, pela disposição e ensinamentos durante todo o mestrado.

Aos membros da banca, pelo auxílio no aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos criados na Residência, e mantidos no mestrado: Ana, Matheus, Jéssica e Ronaldo. Com vocês os dias foram mais leves, e as risadas mais frequentes.

Aos amigos Giselle, Maurício e Danilo. Palavras não são suficientes para expressar a minha gratidão pela amizade, apoio, torcida e puxões de orelha.

Aos meus irmãos adotados: Isabela, Bernardo e Guilherme. Obrigada por garantir que eu tivesse uma família na veterinária.

Aos amigos Aline, Jack, Erick, Gabi, Mayara, Karina, Renata, Tábata, Karine, Mari e Maria Paula pelo apoio e momentos de descontração, essenciais.

Aos amigos Ana, Júlia, Carol e Lucas, por me mostrarem que a distância e correria não mudam a nossa amizade.

Ao Bruno, pela ajuda no desenvolvimento da neurologia dentro deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia, em especial à Ana Flávia e Fabiano. Sem vocês este trabalho não teria acontecido. Ao Cláudio, pela ajuda e paciência durante as longas horas de análises clínicas. Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica, em especial à Profa. Fabíola, Prof. Paulo e Gabriella. Ao Professor Felipe e todos que contribuíram do Laboratório de Patologia Animal.

Ao Danilo Bastos, pelo auxílio durante as análises estatísticas.

À CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma, o meu mais sincero MUITO OBRIGADA!

*“Ainda que seja meu trabalho como neurologista diagnosticar a doença e pensar no tratamento da doença, eu sempre quis tratar a pessoa tanto quanto a doença e fico muito feliz que o meu médico pense da mesma forma. Eu não sou apenas um trabalho para ele. Eu sou uma pessoa reagindo a uma situação. Dessa forma, eu me coloco entre a visão biológica e humanista”.*

Oliver Sacks

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
RESUMO .....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
3.1. Ivermectina.....	16
3.1.1 Toxicidade.....	16
3.1.2 Manifestações Clínicas.....	17
3.1.3 Farmacocinética .....	18
3.1.4 Diagnóstico.....	18
3.1.5 Tratamento .....	19
3.2 Emulsão Lipídica Intravenosa .....	19
3.2.1 Formulações .....	19
3.2.2 Armazenamento .....	20
3.2.3 Mecanismos de Ação nas Intoxicações .....	20
3.2.4 Utilização Terapêutica.....	21
3.2.5 Efeitos adversos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1 Animais .....	24
4.2 Escolha da Formulação e Dose .....	25
4.3 Preparo dos Animais .....	25
4.4 Tratamentos e Grupos Experimentais .....	27
4.5 Avaliação Clínica e Neurológica.....	28
4.6 Coleta e processamento inicial das amostras sanguíneas .....	29
4.7 Hemograma .....	30
4.8 Avaliação Bioquímica .....	30
4.9 Análise Toxicológica.....	31

4.10 Avaliação macroscópica e histopatológica.....	33
4.11 Estatística .....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1 Análises Clínicas.....	33
5.1.1 Frequência Cardíaca, Frequência Respiratória e Temperatura Retal .....	34
5.1.2 Avaliação Neurológica .....	35
5.2 Hemograma .....	37
5.2.1 Eritrograma.....	37
5.2.2 Leucograma .....	40
5.2.2 Plaquetas .....	42
5.3 Análises Bioquímicas.....	42
5.3.1 Ureia e Creatinina.....	42
5.3.2 ALT, AST, GGT e FA .....	44
5.3.3 Glicose.....	45
5.3.4 Triglicérides e Colesterol .....	46
5.3.5 Proteína Total e Albumina .....	48
5.4 Quantificação da Ivermectina em Fígado, Gordura, Encéfalo e Rim.....	49
5.5 Óbitos .....	49
5.6 Avaliação Macroscópica e Histológica .....	50
6. CONCLUSÕES.....	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
9. ANEXOS.....	62
9.1 Certificado do CEUA .....	62



---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1: Identificação dos grupos experimentais e seus tratamentos.

Tabela 2: Escala de pontuação da avaliação neurológica.

Tabela 3: Condições cromatográficas.

Tabela 4: Frequência das alterações clínicas observadas nos animais intoxicados por ivermectina na dose de 80mg/kg (VO).

Tabela 5: Valores fisiológicos normais de frequência cardíaca (batimentos por minuto), frequência respiratória (movimentos por minutos) e temperatura retal (°C) para coelhos.

Tabela 6: Valores médios e desvio padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 7: Valores médios e desvio padrão da frequência respiratória (movimentos por minuto) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 8: Valores médios e desvio padrão da temperatura retal (°C) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 9: Valores médios da pontuação neurológica nos diferentes grupos e tempos avaliados

Tabela 10: Valores de referência dos parâmetros eritrocitários para coelhos.

Tabela 11: Valores médios e desvio padrão da contagem de eritrócitos ( $\times 10^6$  céls/ $\mu$ L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 12: Valores médios e desvio padrão da concentração de hemoglobina (g/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 13: Valores médios e desvio padrão do volume globular (%) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 14: Valores médios e desvio padrão da concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 15: Valores médios e desvio padrão do volume corpuscular médio (fL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 16: Valores de referência dos parâmetros leucocitários para coelhos.

Tabela 17: Valores médios e desvio padrão da contagem total de leucócitos ( $/\mu$ L) nos diferentes grupos e tempos avaliados

Tabela 18: Valores médios e desvio padrão da contagem de neutrófilos segmentados ( $/\mu$ L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 19: Valores médios e desvio padrão da contagem de linfócitos ( $/\mu$ L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 20: Valores médios e desvio padrão da contagem de monócitos ( $/\mu\text{L}$ ) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 21: Valores médios e desvio padrão da contagem de plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 22: Valores de referência dos parâmetros bioquímicos para coelhos.

Tabela 23: Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de ureia (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 24: Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de creatinina (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos

Tabela 25: Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima ALT (UI/L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 26: Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima AST (UI/L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 27: Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima GGT (UI/L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 28: Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima FA (UI/L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 29: Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de glicose (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 30: Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de triglicérides (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 31: Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de colesterol (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 32: Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de proteína total (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 33: Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de albumina (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tabela 34: Médias e desvio padrão da quantificação de ivermectina (mg/kg de tecido) em fígado, gordura, rim e encéfalo nos diferentes grupos.

Tabela 35: Distribuição dos óbitos nos diferentes grupos e tempos.

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1: Estrutura química da 22,23-dihidroavermectina B1 (Ivermectina).

Figura 2: Método de contenção com auxílio de toalha (A-D).

Figura 3: A – Colocação de cateter na artéria auricular. B – Dispositivo PRN acoplado ao cateter na artéria auricular. C – Fixação do cateter acoplado ao PRN na veia auricular marginal.

Figura 4: Colocação de sonda nasogástrica. A – Delimitação de quanto a sonda será introduzida (distância da narina até a última costela). B – Coelho com sonda nasogástrica.

Figura 5 Linha de procedimentos.

Figura 6: Coleta de sangue em cateter acoplado a PRN fixado na artéria auricular.

Figura 7: Metodologia adaptada de QuEChERS. Adaptado de Anastassiades et al., 2003.

Figura 8: Avaliação do estado mental.

Figura 9: Ocorrência de midríase em um animal do grupo IV\_EL.

Figura 10: Gráfico das médias da quantificação de ivermectina (mg/kg de tecido) em fígado, gordura, rim e encéfalo nos diferentes grupos.

Figura 11: Rim, cortical: hiperemia passiva (congestão) multifocal discreta (setas). HE: 40x.

Figura 12: Fígado: degeneração micro- e macro vacuolar multifocal discreta. HE: 400x.

## RESUMO

Na medicina veterinária intoxicações acidentais pela ivermectina, um fármaco de alta lipofilicidade, são frequentes, e um antídoto não é conhecido. A utilização da emulsão lipídica intravenosa (ELI) no tratamento de intoxicações por agentes lipofílicos está se tornando cada vez mais comum. Existem relatos da utilização desta terapia na intoxicação por ivermectina, porém ao conhecimento do autor ainda não existem estudos experimentais controlados para avaliar o efeito deste tratamento. O objetivo deste trabalho foi observar as alterações manifestadas por coelhos Nova Zelândia intoxicados pela ivermectina, e o efeito da ELI nestes animais, além de avaliar a segurança desta terapia. Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=6). No momento zero foi administrada ivermectina por via nasogástrica na dose de 8ml/kg (80mg/kg) em três grupos, enquanto o quarto grupo recebeu o mesmo volume de solução fisiológica. Dos grupos expostos à ivermectina o primeiro não recebeu tratamento posterior, enquanto três horas após a administração da ivermectina, o segundo recebeu infusão de ringer lactato (bolus inicial de 2ml/kg seguido por infusão contínua na taxa de 0,25ml/kg/min durante 60 minutos) e o terceiro recebeu infusão de emulsão lipídica a 20% na mesma dose. O quarto grupo recebeu somente a infusão lipídica. Todos os animais foram submetidos à avaliação clínica e neurológica nos tempos zero, uma hora e meia, três, quatro e seis horas, e à coleta de sangue para análise hematológica e bioquímica nos tempos zero, três, quatro e seis horas. A análise hematológica consistiu de realização de hemograma completo, enquanto a bioquímica de mensuração sérica das concentrações de ureia, creatinina, triglicérides, colesterol, glicose, albumina e proteína total, e da atividade das enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama-glutamyltransferase e fosfatase alcalina. Os animais foram eutanasiados no momento seis horas, imediatamente após a qual foram coletadas amostras de rim, fígado, encéfalo e gordura para análise toxicológica baseada na quantificação da ivermectina, extraída pelo método modificado de QuEChERS e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência seguida de espectrometria de massa. Para posterior análise histopatológica, também foram obtidas amostras de rim, fígado, encéfalo e baço. Todos os animais expostos à ivermectina manifestaram alteração clínica compatível com intoxicação por este fármaco, como bradipneia, hipotermia e, principalmente, alterações neurológicas. Dentre as alterações neurológicas foi observada alteração na postura e estado mental, alteração dos nervos cranianos, da marcha, dos reflexos posturais e miotáticos, do tônus e do padrão respiratório, presença de tremores e alteração na capacidade de retornar à posição inicial quando colocados em decúbito dorsal. Alguns animais apresentaram manifestações compatíveis com alterações de neurônio motor inferior, as quais não são encontradas com frequência neste tipo de intoxicação. A ivermectina causou aumento intenso na concentração sérica de glicose e triglicérides, e aumento de ureia e creatinina dentro dos valores de normalidade da espécie. Em associação às observações histopatológicas dos órgãos coletados, concluiu-se que a intoxicação por ivermectina não causou lesão renal ou hepática significativa, assim como não resultou em alteração histopatológica nestes órgãos, no encéfalo e baço. A análise toxicológica demonstrou maior acúmulo de ivermectina no tecido gorduroso e no fígado, seguido do rim e, por último, encéfalo. Os animais que receberam a infusão de ELI não apresentaram melhora clínica significativa ou alteração na concentração de ivermectina nos órgãos. É possível, porém, que caso o tratamento fosse realizado mais cedo, ou a monitoração fosse mantida por um período maior, um efeito da emulsão sobre estes parâmetros teria sido observado. A ELI se mostrou clinicamente e histologicamente segura, apesar de causar aumento significativo na concentração sérica de triglicérides e colesterol.

**Palavras-chave:** ácidos graxos, ivermectina, coelho, intoxicação.

## ABSTRACT

Accidental poisonings by ivermectin, a highly lipophilic drug, are common in veterinary medicine, but still no antidote is known. The use of intravenous lipid emulsions (ILE) in toxicosis caused by lipophilic agents is becoming more common each day. Although there are reports of the use of this therapy in ivermectin poisoning, to the author's knowledge there are no experimental controlled studies to assess the effect of this treatment. The aim of this study was to observe the changes caused by ivermectin toxicity in New Zealand rabbits, the effect of ILE in these animals, and to evaluate the safety of this therapy. Twenty four New Zealand rabbits were randomly divided into four groups (n = 6). At time zero ivermectin was given through nasogastric tube at a dose of 8ml/kg (80mg/kg) to three groups, while the fourth group received the same volume of saline. Of the three groups exposed to ivermectin, the first did not received further treatment, while, three hours after this drug was administrated, the second received lactated Ringer intravenous infusion (initial bolus of 2ml/kg followed by continuous infusion at the rate of 0.25ml/kg/min for 60 minutes) and the third received 20% lipid emulsion at that same rate. The fourth group only received lipid emulsion. All animals underwent clinical and neurological evaluation at time zero, one and a half, three, four and six hours, and blood sampling for hematological and biochemical analysis at time zero, three, four and six hours. Hematological analysis consisted of complete blood count, while serum biochemistry consisted of measurement of urea, creatinine, triglycerides, cholesterol, glucose, albumin and total protein concentrations, and alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma glutamyl transferase and alkaline phosphatase enzyme activity. Animals were euthanized six hours after ivermectin or saline was administrated, after which kidney, liver, brain and fat samples were immediately collected for toxicological analysis. This was based on quantification of ivermectin, extracted by the modified method of QuEChERS and detected by high-performance liquid chromatography followed by spectrometric mass. For histopathologic analysis, kidney, liver, brain and spleen samples were also obtained. All animals exposed to ivermectin manifested clinical changes consistent with toxicosis, such as bradypnea, hypothermia and, most commonly, neurological alterations. Among the neurological changes, altered posture, mentation, cranial nerves, gait, postural and myotatic reflexes, muscle tone and breathing patterns, as well as the presence of tremors and impaired ability to return to the starting position when placed in the supine dorsal recumbent position were observed. A few animals showed manifestations compatible with lower motor neuron lesion, which are not frequently found in this type of poisoning. Ivermectin caused intense increase in serum glucose and triglyceride levels, and increased urea and creatinine, but these remained within the reference range. With these findings, associated with the pathological observations in the organs sampled, it was concluded that ivermectin poisoning caused no significant liver or kidney damage, as well as no liver, kidney, brain and spleen histopathologic change. Toxicological analysis showed greater ivermectin concentration in adipose tissue and liver, followed by kidney and, finally, brain. The animals that received ILE infusion showed no significant clinical improvement or change in ivermectin concentration. It is possible, however, that if the treatment was performed earlier or monitoring was maintained for a longer period, an effect of the ILE on these parameters would have been observed. Lipid emulsion infusion was considered clinically and histologically safe, despite causing a significant increase in serum triglycerides and cholesterol.

**Keywords:** fatty acids, avermectin, rabbit, intoxication.

## 1. INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, intoxicações medicamentosas são comuns. Elas podem ocorrer por erro na dose administrada, uso de composto ou formulação inadequada, ou pela ingestão acidental pelo animal (Oehme, 1991; Caloni et al., 2014). Dentre as intoxicações causadas em pequenos animais pela exposição inadequada a produtos veterinários, os parasiticidas, como a ivermectina, são os mais comumente envolvidos (Caloni et al., 2014).

Devido a sua eficiência bem estabelecida, a ivermectina é um dos fármacos antiparasitários mais utilizados mundialmente (Dadarkar et al., 2007; Canga et al., 2009). Apesar de apresentar ampla margem de segurança, intoxicações por este fármaco ocorrem em raças e indivíduos mais sensíveis, ou quando há exposição a uma dose extremamente elevada deste medicamento (Dorman, 2006).

A ivermectina atua ao se ligar aos receptores gabaérgicos no sistema nervoso central (SNC), resultando na ativação e abertura prolongada dos canais para cloro. Os íons de cloro entram nas células neurais e causam hiperpolarização da membrana pós-sináptica, impedindo a sua transmissão nervosa (Schonrock e Bormann, 1993; Trailovic e Nedeljkovic, 2011). Desta forma, as principais alterações observadas nos animais intoxicados são neurológicas (Jourdan et al., 2015). Em cães, esta síndrome aguda é manifestada classicamente por midríase, alteração do estado mental, tremores, ataxia, hipersalivação e bradicardia (Pulliam e Preston, 1989; Ray, 1991; Gupta, 2007).

Apesar destas ocorrências já terem sido bem estabelecidas, ainda não existe um antídoto específico para intoxicação pela ivermectina, sendo o tratamento somente sintomático e de suporte (Gupta, 2007).

As emulsões lipídicas intravenosas (ELI) são utilizadas como fonte de ácidos graxos livres em pacientes humanos que necessitam de suplementação nutricional há mais de 40 anos (Driscoll, 2006; Turner-Lawrence e Kerns, 2008). Recentemente, estas infusões lipídicas também têm sido usadas visando à reversão de intoxicações graves por anestésicos locais ou outros fármacos lipofílicos (Weinberg et al., 2003; Weinberg et al., 2006; Litz et al., 2008; Turner-Lawrence e Kerns, 2008; Fernandez et al., 2011).

Uma vez que a ivermectina é altamente lipofílica, a utilização da ELI no tratamento das toxicoses causadas por esta substância pode ser benéfica. Existem relatos da utilização da ELI em intoxicações pela ivermectina que corroboram a esta hipótese (Bruenisholz et al., 2012; Bates et al., 2013; Epstein e Hollingsworth, 2013; Jourdan et al., 2015; Saqib et al., 2015).

O primeiro relato da efetividade deste tipo de terapia em intoxicações ocorreu em ratos, nos quais foi observado aumento do limiar de toxicidade para bupivacaína nos animais que receberam pré-tratamento com a ELI (Weinberg et al., 1998).

Após estudos experimentais e relatos sobre o benefício da utilização das ELI em intoxicações por anestésicos locais, foi criada a hipótese de que os efeitos benéficos observados poderiam ser extrapolados para outros agentes que apresentam lipofilicidade semelhante a estes fármacos (Cave e Harvey, 2009).

Dentre as toxicoses em que foi observada aparente melhora clínica devido ao tratamento com a terapia lipídica, tem-se a com bupivacaína (Weinberg et al., 1998; Weinberg et al., 2003; Weinberg et al., 2006), com moxidectina (Crandell e Weinberg, 2009), com propranolol e etanol (Jovic-Stosic et al., 2011), com ropivacaína (Bonfim et al., 2012), com ivermectina (Epstein e Hollingsworth, 2013), com permetrina (Kuo e Odunayo, 2013), com amiodarona (Niiya et al., 2010) e com baclofeno (Butler, 2014). Também foi relatada melhora clínica em um caso de sobredose mista de amitriptilina, diazepam, petidina, nizatidina e ibuprofeno (Oti et al., 2010).

Acredita-se que a utilização da ELI pode permitir, além de maior sobrevivência, redução do tempo de recuperação e de hospitalização dos animais intoxicados. Com isto, um custo menor é gerado aos proprietários, e animais que seriam eutanasiados por questões financeiras passam a ter uma chance de recuperação (Kuo e Odunayo, 2013). É importante ressaltar que um antídoto deve apresentar uma baixa 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 (Turner-Lawrence e Kerns, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho é determinar, inicialmente, como coelhos Nova Zelândia se comportam como modelo experimental da intoxicação por ivermectina após administração por via nasogástrica, através da avaliação da dose necessária para tal manifestação, da ocorrência de alterações clínicas, hematológicas e histopatológicas, e de análise quantitativa toxicológica. Em seguida, objetiva-se avaliar o efeito da infusão de emulsão lipídica nestes animais, e a segurança desta terapia, através de análises clínicas, laboratoriais, histológicas e toxicológicas. Com estas informações, é proposta a busca de novos tratamentos para intoxicações causadas por agentes lipofílicos para os quais não há antídoto.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Ivermectina

As avermectinas são lactonas macrocíclicas, obtidas como compostos da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermitilis*, que apresentam alta atividade antiparasitária (Chabala et al, 1980; Campbell et al., 1983; Campbell, 2012; Rubies et al., 2015). Elas apresentam quatro componentes estruturais, nomeados de avermectina A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Cada um destes apresenta dois subcomponentes (A<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub>, B<sub>1a</sub>, B<sub>1b</sub>, B<sub>2a</sub> e B<sub>2b</sub>) (Campbell, 2012).

Um dos derivados químicos modificados, ou semi-sintéticos, das avermectinas é a ivermectina. A estrutura da ivermectina é apresentada na Figura 1. Ela é caracterizada por conter pelo menos 80% de 22,23-dihidroavermectina-B<sub>1a</sub> e não mais do que 20% de 22,23-dihidroavermectina-B<sub>1b</sub> (Campbell, et al., 1983; Chiu et al., 1990b; Canga et al., 2009; Campbell, 2012; Rubies et al., 2015).

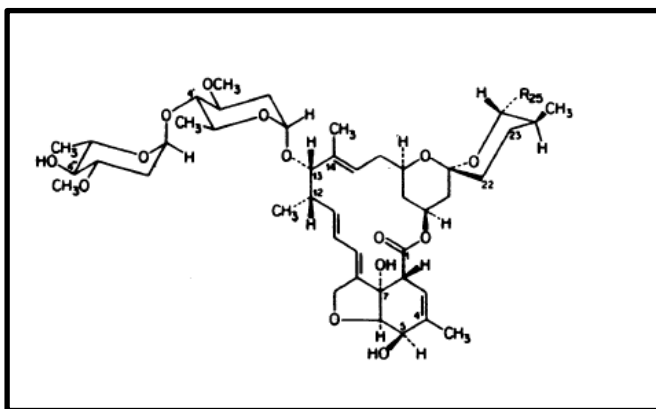


Figura 1. Estrutura química da 22,23-dihidroavermectina B1 (Ivermectina) (Campbell et al., 1983).

A sua alta eficiência foi comprovada contra nematodes como *Haemonchus* spp, *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Ostertagia* spp., *Dictyocaulus viviparus*, *Dirofilaria immitis* (forma imatura), *Psoroptes* e *Sarcoptes*, dentre outros (Chabala et al, 1980; Campbell, 1983).

A ivermectina se mostrou extremamente benéfica por apresentar, em um mesmo produto, potência excepcional em doses extremamente baixas contra amplo espectro de nematodes e artrópodes em diferentes espécies. Ela pode ser administrada com efetividade por diferentes vias, além de apresentar boa tolerância pelos hospedeiros, com ampla margem de segurança. Por estes motivos, ela é um dos fármacos parasiticidas mais utilizados mundialmente (Campbell et al., 1983; Dadarkar et al., 2007; Canga et al., 2009; Campbell, 2012).

##### 3.1.1 Toxicidade

A ivermectina atua ao interagir com os receptores do ácido gama aminobutírico (GABA) e potencializar os canais para cloro ligados a este. Há, como resultado, ativação e prolongamento da abertura dos canais para cloro. Os íons cloro entram nas células neurais e hiperpolarizam a membrana pós-sináptica, impedindo a transmissão dos impulsos nervosos (Lankas e Gordon, 1989; Ray, 1991; Gupta, 2007; Schonrock e Bormann, 1993; Trailovic e Nedeljkovic, 2011; Campbell, 2012).



Nos mamíferos, os neurônios mediados pelo GABA são encontradas somente no SNC (Campbell et al., 1983). Desta forma, a toxicidade da ivermectina nestes animais foi relacionada com a sua entrada no SNC (Dadarkar et al., 2007; Ménez et al., 2012).

Em animais saudáveis sob condições normais, o transportador p-glicoproteína presente na barreira hemato-encefálica restringe a entrada da ivermectina no encéfalo e previne sua ligação aos receptores GABA. Existem, porém, animais que apresentam deficiência desta proteína e, por isto, são mais susceptíveis à intoxicação pela ivermectina (Lankas et al., 1997; Ménez et al., 2012). Camundongos com deficiência da p-glicoproteína apresentaram neurotoxicidade com doses 100 vezes mais baixas do que as relatadas em outras espécies e outras linhagens de camundongos. Após a exposição à ivermectina, estes animais apresentaram concentrações plasmática e tecidual deste fármaco mais altas do que os animais sem essa alteração (Lankas et al., 1997).

Roulet et al. (2003) observaram uma correlação entre a eliminação espontânea do gene MDR1 e a manifestação do fenótipo canino de sensibilidade à ivermectina. Este defeito genético foi traduzido em deficiência na quantidade de p-glicoproteína e na sua função. O defeito consequente na p-glicoproteína resulta em acúmulo de altas concentrações de ivermectina no SNC, mesmo na administração de doses baixas (Roulet et al., 2003; Merola et al., 2009).

A maior preocupação quanto a esta susceptibilidade ocorre em cães da raça Collie, Border Collie, Pastor de Shetland, Pastor Australiano e Old English Sheepdog e seus mestiços. Nestes animais, doses baixas, consideradas seguras, podem resultar em intoxicação grave (Hopper et al., 2002; Nelson et al., 2003; Gupta, 2007; Salzo, 2008).

Merola et al. (2009) relataram que cães de raças consideradas historicamente como normais para a função da p-glicoproteína podem apresentar sinais de intoxicação em doses previamente classificadas como de baixo risco (0,2 – 2,5mg/kg). É possível que outros mecanismos além da deficiência da p-glicoproteína estejam envolvidos na maior sensibilidade de alguns indivíduos à ivermectina. Acredita-se que filhotes que ainda apresentam barreira hemato-encefálica imatura podem ser mais susceptíveis a intoxicações por ivermectina (Sanford et al., 1998; Salzo, 2008; Merola et al., 2009; Ghane, 2011; Mohsen et al., 2012).

Embora existam raças e indivíduos mais susceptíveis à intoxicação por ivermectina, qualquer membro de uma raça ou espécie pode ser intoxicado ao receber uma dose extremamente alta deste medicamento (Dorman, 2006). Nestes casos, grandes quantidades de ivermectina podem persistir no SNC quando a capacidade de remoção pela p-glicoproteína é excedida (Merola et al., 2009). A exposição à alta concentração de ivermectina pode ocorrer devido à administração de dose inadequada pelo proprietário ou veterinário, ingestão acidental de grande quantidade de ivermectina, ou utilização de formulações inadequadas, como a exposição de pequenos animais a produtos mais concentrados destinados a grandes animais (Oehme, 1991; Hopper et al., 2002; Merola et al., 2009; Caloni et al., 2014). Lankas e Gordon (1989) relataram a DL<sub>50</sub> oral para cães normais próxima de 80mg/kg, enquanto em ratos esta dose é de 50mg/kg.

### **3.1.2 Manifestações Clínicas**

As principais alterações manifestadas nos animais intoxicados são neurológicas (Jourdan et al., 2015). A presença de mielina e outras lipoproteínas favorecem a distribuição de substâncias lipofílicas no sistema neural (Dorman, 2006).

Segundo Lankas e Gordon (1989), a midríase é o sinal mais sensível de intoxicação pela ivermectina em cães. Jourdan et al. (2015) também relataram midríase em todos os gatos intoxicados, sendo este o primeiro sinal clínico observado e o último a ser corrigido.

As principais manifestações clínicas em cães e gatos são midríase, alteração do estado mental, hipersalivação, resposta à ameaça ausente, redução do reflexo pupilar à luz, cegueira, ataxia, paresia, tremores musculares e alterações proprioceptivas. Existem relatos, também, de vômito,

taquipneia, bradipneia, bradicardia, hiperestesia, nistagmo, crises epilépticas e coma, podendo evoluir para o óbito (Pulliam e Preston, 1989; Ray, 1991; Gupta, 2007; Hopper et al., 2002; Nelson et al., 2003; Roulet et al., 2003; Merola et al., 2009; Bates et al., 2013; Jourdan et al., 2015). De forma similar, foi descrita, em animais laboratoriais intoxicados pela ivermectina, a ocorrência de letargia, sonolência, ataxia, tremores, bradipnéia, coma e óbito (Lankas e Gordon, 1989; Lankas et al., 1997; Ménez et al., 2012).

Bruenisholz et al. (2012) relataram crises epilépticas generalizadas, inconsciência, decúbito, ausência dos reflexos palpebral e pupilar e da resposta à ameaça, presença de nistagmo espontâneo, redução do tônus da língua, e hipotermia em pônei da raça Shetland miniatura de 11 meses de idade intoxicado por ivermectina.

Jourdan et al. (2015) sugeriram que animais com escore corporal baixo podem apresentar sinais clínicos mais graves na intoxicação por ivermectina.

### **3.1.3 Farmacocinética**

Em geral, as propriedades farmacocinéticas da ivermectina são caracterizadas pela ampla distribuição devido a sua alta lipofilicidade, baixo metabolismo, lenta eliminação, e relação linear com a dose (Al-Azzam et al., 2007; Gupta 2007; Canga et al., 2009).

Ao avaliar a distribuição tecidual da ivermectina em vacas, ovelhas, ratos e suínos, foi observada maior concentração de seus resíduos no fígado e tecido gorduroso destes animais. O tecido gorduroso permaneceu com concentrações mais altas por tempo mais prolongado, o que demonstra seu potencial efeito reservatório de ivermectina. Em ratos e suínos o encéfalo apresentou a concentração mais baixa, provavelmente devido à proteção da barreira hematoencefálica e à ação da p-glicoproteína (Chiu et al., 1990a; Chiu et al., 1990b).

A ivermectina sofre pouco metabolismo, sendo a maior parte da dose excretada sem alterações. Desta forma, o seu maior componente encontrado nos tecidos é a inalterada (Cambell et al., 1983; Canga et al., 2009).

Estudos farmacocinéticos da ivermectina relatam meia vida plasmática terminal de 0,5 a 13 dias (Lo et al., 1985; Perez et al., 2002; Bassissi et al., 2006; Al-Azzam et al., 2007; Gokbulut et al., 2010), e esta pode variar com a espécie envolvida, as diferentes formulações e a via de administração (Lo et al., 1985). Coelhos Nova Zelândia que receberam ivermectina por via subcutânea (SC) apresentaram meia vida plasmática média de 1,5 a 2,89 dias (Perez et al., 2002; Bassissi et al., 2006; Gokbulut et al., 2010). Ao conhecimento do autor, não existem experimentos realizados em coelhos para a avaliação da farmacocinética da ivermectina administrada por via oral.

Independente da via de administração (oral, subcutânea ou tópica), a ivermectina é eliminada principalmente por via fecal (90% da dose administrada), sendo a bile a principal via de excreção. Menos de 2% é eliminado na urina (Gupta, 2007; Canga et al., 2009).

### **3.1.4 Diagnóstico**

O diagnóstico é realizado em geral de forma presuntiva, de acordo com o histórico e os sinais clínicos do animal (Hopper et al., 2002). Relatos de animais intoxicados de forma aguda pela ivermectina citam neurotoxicidade sem anormalidades aparentes nos exames de patologia clínica (hemograma, perfil bioquímico e urinálise), necroscópicos e histopatológicos (Lankas et al., 1997; Sanford et al., 1998; Hopper et al., 2002; Nelson et al., 2003; Ghane et al., 2011; Mohsen et al., 2012; Epstein e Hollingsworth, 2013). Por outro lado, relatos experimentais em ratos e coelhos, com a administração da ivermectina em dose terapêutica ou administração crônica, citam alterações na concentração de hemoglobina, no volume globular, na concentração sérica de glicose, ureia, creatinina, albumina, proteína total, colesterol e na atividade sérica das enzimas fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama-

glutamyltransferase. Relatam, também, alterações histopatológica em fígado, rins e testículos após uso prolongado (Seri et al., 2001a; Seri et al., 2001b; Arise e Malomo, 2009; Elzoghby et al., 2015).

A confirmação do diagnóstico pode ser realizada pela mensuração da concentração sérica ou tecidual da ivermectina (Hopper et al., 2002). Diferentes métodos de extração de resíduos de ivermectina foram desenvolvidos (Hernando et al., 2007). Anastasiades et al. (2013) propuseram um método de extração de resíduos de pesticidas conhecido como QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Este envolve a combinação de uma extração inicial através da utilização da acetonitrila, de partição após adição dos sais sulfato de magnésio e cloreto de sódio, e uma etapa de limpeza (*clean-up*) com a utilização de extração em fase sólida dispersiva (Anastasiades et al., 2003; Prestes et al., 2011; Rubies et al., 2015). Adaptações do método de QuEChERS foram desenvolvidas para contornar problemas de estabilidade que alguns compostos apresentavam de acordo com o pH da matriz (Prestes et al., 2011). Esta é uma das abordagens propostas para a análise de avermectinas de forma simples e com alto rendimento (Rubies et al., 2015).

O método de cromatografia líquida de alta performance seguida de espectrometria de massa (LC-MS/MS) permite a determinação e quantificação seletiva e sensível da ivermectina de forma rápida, eficiente e adequada (Hernando et al., 2007; Inoue et al., 2009; Bruenisholz et al., 2012). Atualmente, a cromatografia líquida acoplada a um espectrofotômetro de massa triplo quadrupolo é a técnica de escolha para a análise confirmatória da presença das avermectinas (Rubies et al., 2015).

### **3.1.5 Tratamento**

Não existe um antídoto específico para intoxicações pela ivermectina. Deste modo, a terapia preconizada atualmente é baseada na descontaminação do animal, tratamento sintomático e de suporte (Nelson et al., 2003; Gupta, 2007).

Os animais que permanecem em decúbito devem receber cuidados de enfermagem adequados, sendo mantidos em local acolchoado, com troca de decúbito frequente e realização de fisioterapia (Hopper et al., 2002).

Indivíduos com intoxicação grave pela ivermectina podem apresentar deficiência respiratória, sendo imprescindível a realização de oxigenioterapia ou até mesmo ventilação mecânica. Em casos de ocorrência de crises epiléticas estas devem ser prontamente controladas, porém o uso do benzodiazepínico diazepam é contra-indicado, uma vez que ele apresenta potencial efeito sinérgico à ivermectina (Hopper et al., 2002).

É importante ressaltar que o tratamento e suporte destes animais podem ser necessários por períodos longos, o que resulta em um alto custo (Hopper et al., 2002).

## **3.2 Emulsão Lipídica Intravenosa**

### **3.2.1 Formulações**

As emulsões lipídicas são componentes caloricamente densos e fontes de ácidos graxos. Estão disponíveis comercialmente em soluções isotônicas de 10% ou 20%. São feitas primariamente de óleo de soja e cártamo, e fornecem principalmente ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, incluído o linoleico, oleico, palmítico e ácidos esteáricos. Estas soluções são emulsificadas com fosfolipídios da gema do ovo e sua tonicidade é ajustada com glicerol. As partículas gordurosas emulsificadas são comparadas, em tamanho, aos quilomícrons e são removidas da circulação por meio da ação da lipoproteína periférica lipase (Chan, 2005; Driscoll, 2006; Bonfim et al., 2012).

Em qualquer emulsão, a estabilidade é demonstrada pela manutenção da distribuição do tamanho dos glóbulos de gordura. A desestruturação de um sistema de emulsão é manifestada pela fusão das gotículas que por fim se separam da fase dispersa como um grande glóbulo de gordura através do processo conhecido como coalescência. De uma perspectiva clínica, o limite do tamanho dos glóbulos nestas emulsões é o mais importante, uma vez que reflete, em última análise, a segurança da formulação. Segundo a farmacopeia dos Estados Unidos (*United States Pharmacopeia*), o tamanho médio das gotículas não pode exceder 500nm, independente da concentração final da emulsão (Driscoll, 2006; Fernandez et al., 2011).

O intervalo proposto para o pH das ELI é entre 6,0 e 9,0, e este limite deve ser mantido durante o tempo de validade do produto (entre 18 e 24 meses). Inicialmente o pH é mais próximo de 9,0, mas com o tempo e a degradação hidrolítica dos triglicérides de cadeia longa, este se aproxima de 6,0. À medida que o pH reduz, a carga eletrostática iônica estabilizante criada ao redor das gotículas pelos fosfolipídios do ovo também decai, interferindo na estabilidade da emulsão (Driscoll, 2006).

A concentração de ácidos graxos livres em emulsões lipídicas injetáveis reflete a estabilidade relativa do fosfolipídio emulsificador. Desta forma, a limitação da quantidade de ácidos graxos livres nas emulsões lipídicas comerciais é, primariamente, uma medida que visa melhorar a estabilidade dos principais componentes da emulsão, além de minimizar a exposição aos subprodutos da hidrólise e reduzir potenciais efeitos clínicos adversos subsequentes (Driscoll, 2006). A concentração de ácidos graxos livres deve ser menor que 0,07mEq/g (Fernandez et al., 2011).

### 3.2.2 Armazenamento

Estresse físico e químico podem reduzir o tempo de validade e a segurança das ELI. As recomendações do produtor acerca do transporte, armazenamento e manuseio devem ser seguidas para minimizar as variáveis que podem acelerar o processo de desestabilização. Estas recomendações variam com o produtor, o tipo de emulsão e o tipo de embalagem do produto (Driscoll, 2006; Fernandez et al., 2011).

Ao se usar estes produtos é essencial uma técnica asséptica minuciosa para que o risco de contaminações bacterianas seja evitado. A fração não utilizada da ELI deve ser armazenada de forma protegida e sob refrigeração (2-8°C), e descartada após um período de 24 horas (Fernandez et al., 2011).

### 3.2.3 Mecanismos de Ação nas Intoxicações

O mecanismo preciso pelo qual as ELI aumentam a taxa de recuperação e os esforços convencionais de ressuscitação em casos de intoxicação por fármacos lipofílicos é desconhecido (Fernandez et al., 2011). As teorias atuais relacionam o seu efeito à melhora da função metabólica miocárdica, ou ao efeito conhecido como *lipid sink* (Weinberg et al., 2003; Weinberg et al., 2006; Fernandez et al., 2011; Bruenisholz et al., 2012).

O efeito benéfico sobre o desempenho cardíaco pode ocorrer devido à ação direta dos lipídios sobre o miocárdio ou pela reversão da disfunção cardíaca causada pelo agente tóxico específico. Dentre os efeitos potenciais diretos tem-se a utilização dos ácidos graxos livres como fonte energética para o miocárdio e aumento do cálcio intracelular (Weinberg et al., 2003; Fernandez et al., 2011).

Foi observado que a emulsão lipídica tem a capacidade de reverter a depressão cardiovascular em modelos animais de intoxicação por bupivacaína, sendo capaz de acelerar a recuperação da assistolia induzida por este anestésico, reduzir a quantidade desse agente no miocárdio e aumentar a eliminação cardíaca (Weinberg et al., 2006).

O efeito *lipid sink*, ou efeito de sequestro, se baseia na extração das moléculas lipídicas da fase plasmática aquosa para o compartimento lipídico expandido pela administração da ELI. Com isto, o nível de fármacos livres é reduzido, e estas moléculas se tornam menos disponíveis para o tecido, uma vez que permanecem neste novo compartimento criado (Weinberg et al., 1998; Weinberg et al., 2003; Weinberg et al., 2006; Cave e Harvey, 2009; Fernandez et al., 2011). A observação do aumento na concentração plasmática do agente tóxico após a administração das ELI corrobora com essa teoria (Bruenisholz et al., 2012).

Niyya et al. (2010) observaram que suínos que receberam lipídios administrados por via intravenosa (IV) simultaneamente à administração de amiodarona apresentaram concentrações mais altas deste fármaco na fração lipídica do plasma em comparação ao grupo controle, que recebeu solução Ringer ao invés das ELI. Foi observado, também, que estes animais apresentaram menor redução da pressão arterial média causada pela amiodarona. Com estes dados, foi concluído que os lipídios administrados por via IV tiveram efeito de sequestro sobre a amiodarona, como é proposto pela teoria de *lipid sink*, prevenindo a ação hipotensiva deste fármaco. Bruenisholz et al. (2012) relatam, de forma similar, aumento na concentração plasmática de ivermectina após a administração da ELI em um pônei intoxicado pelo fármaco.

Embora os efeitos metabólicos das ELI tenham algum papel na melhora da função cardíaca em pacientes intoxicados por anestésicos locais, o fato destas emulsões também serem usadas com sucesso no manejo de toxicoses por fármacos lipofílicos não-cardiotóxicas levanta a possibilidade de que a teoria do “sequestro” é o principal mecanismo responsável pelo seu uso como antídoto (Gwaltney-Brant e Meadows, 2012).

### 3.2.4 Utilização Terapêutica

Após reunir publicações de dados experimentais animais e relatos de casos humanos, a Associação de Anestesiologistas da Grã-Bretanha e Irlanda (*Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland*) recomenda, desde 2007, que as emulsões lipídicas estejam imediatamente disponíveis para todos os pacientes que recebam doses potencialmente cardiotóxicas de anestésicos locais. Desde então, a utilização da emulsão lipídica nos departamentos de anestesia tem sido exponencial (Picard et al., 2009).

Na medicina humana, a terapia com ELI geralmente é reservada para casos de intoxicação grave, em que a vida do paciente está em risco, ou quando os parâmetros fisiológicos do paciente não melhoraram após o uso da terapia convencional (Fernandez et al., 2011).

Até que maiores informações estejam disponíveis, o uso das ELI em intoxicações na medicina veterinária deve ser considerado um tratamento experimental, sendo indicado em toxicidades associadas com alta morbidade, principalmente em casos em que a terapia tradicional falhou ou é inviável devido ao custo (Fernandez et al., 2011; Gwaltney-Brant e Meadows, 2012).

Nos casos em que exista uma terapia ou antídoto efetivo para um dado agente tóxico, é aconselhado que este seja utilizado ao invés da terapia lipídica. Porém, caso o paciente apresente colapso cardiovascular secundário à intoxicação por anestésicos locais ou outros fármacos lipofílicos, ou demonstre sinais clínicos graves de intoxicação por baclofeno, ivermectina ou moxidectina, o uso da emulsão lipídica pode ser fortemente considerado (Fernandez et al., 2011). Bruenisholz et al. (2012) e Jourdan et al. (2015) também sugerem forte benefício da utilização das ELI em intoxicações por ivermectina.

Atualmente não há uma dose ou frequência ideal estabelecida para o uso das ELI na medicina veterinária. A dose utilizada é extrapolada dos dados da medicina humana (Fernandez et al., 2011; Kuo e Odunayo, 2013).

A monitoração cuidadosa da resposta do animal à terapia e de possíveis efeitos adversos auxilia a ditar em quais momentos as infusões adicionais são necessárias ou quando a infusão deve ser interrompida (Kuo e Odunayo, 2013). Embora não existam dados específicos sobre a dose

máxima segura de administração de lipídios em cães e gatos, é prudente que a concentração sérica de triglicérides seja mantida no seu intervalo normal (Chan, 2005). O soro deve ser monitorado a cada 2 horas e infusões adicionais só devem ser consideradas em animais que permanecem sintomáticos e livres de lipemia (Gwaltney-Brant e Meadows, 2012).

É provável que o protocolo mais adequado varie com os agentes tóxicos envolvidos e com as espécies acometidas, porém atualmente essa informação não está disponível. Os protocolos relatados na medicina veterinária utilizam solução lipídica a 20%, e as infusões são administradas, em geral, em bolus lento seguido de infusão contínua por 30 a 60 minutos através de um cateter venoso central ou periférico (Gwaltney-Brant e Meadows, 2012). Uma vez que as ELI disponíveis comercialmente são isotônicas, estas podem ser administradas com segurança através de cateter intravenoso periférico (Briscoll, 2006; Fernandez et al., 2011).

Fernandez et al. (2011), recomendam em cães a administração de um bolus de 1,5-4mL/kg, IV no período de 1 minuto, seguido de infusão contínua na taxa de 0,25ml/kg/min, IV, durante 30 a 60 minutos. Animais que não respondem a este protocolo de tratamento podem receber pequenas doses adicionais lentamente até 7ml/kg, IV. É recomendado, também, administração intermitente de bolus de 1,5ml/kg a cada 4 a 6 horas durante as primeiras 24 horas. A infusão contínua na taxa de 0,05ml/kg/h pode ser mantida até melhora dos sinais clínicos, desde que não ultrapasse 24 horas (Fernandez et al., 2011). Os pacientes devem ser mantidos sob supervisão do médico veterinário até que os sinais clínicos sejam revertidos e o soro não esteja mais lipêmico (Gwaltney-Brant e Meadows, 2012).

Existem relatos da utilização desta terapia em intoxicações na medicina veterinária (Quadro 1), porém ao conhecimento do autor ainda não existem estudos experimentais controlados para avaliar o efeito deste tratamento em intoxicações por ivermectina.

Quadro 1: Resumo de estudos experimentais e relatos em que a ELI foi utilizada para reverter intoxicações na medicina veterinária.

ESTUDO	ESPÉCIE	N	FÁRMACO	DOSE UTILIZADA	RESULTADOS
<b>Harvey e Cave (2008); Experimento animal prospectivo, randomizado e controlado.</b>	Coelho	10	- Propranolol	- ELI 20%, IV (6ml/kg, no período de 4 minutos).	A infusão de ELI atenuou a hipotensão induzida pelo propranolol.
<b>Crandell e Weinberg (2009); Relato de caso.</b>	Cão	1	- Moxidectina	- ELI 20%, IV (bolus inicial de 2ml/kg + 0,066ml/kg/min durante 4 horas). Repetição após 15 horas, na taxa de 0,5ml/kg/min durante 30 minutos.	Aparente reversão dos sinais de toxicidade da moxidectina após a administração da ELI.
<b>Bruenisholz et al. (2012); Relato de caso.</b>	Cavalo (Pônei)	1	- Ivermectina	- ELI 20%, IV (bolus inicial de 1,5ml/kg + 0,025ml/kg/min durante 30 minutos); protocolo realizado duas vezes no mesmo animal com intervalo de 19 horas.	Intensa melhora clínica após a administração da ELI.

<b>Bates et al. (2013); Relato de caso.</b>	Cão	5	- Moxidectina  - Ivermectina  - Moxidectina  - Moxidectina  - Baclofeno	- ELI 20%, IV (bolus inicial de 1,5ml/kg + 0,25ml/kg/min durante 30 minutos; repetição da infusão por 30 minutos adicionais). -ELI 20%, IV (bolus inicial de 1,5ml/kg + 0,125ml/kg/min durante 60 minutos). - ELI 20%, IV (bolus inicial de 1,5ml/kg + 0,25ml/kg/min durante 30 minutos). - ELI 20%, IV (bolus inicial de 1,48ml/kg + 0,28ml/kg/min durante 28 minutos). - ELI 20%, IV (bolus inicial de 1,5ml/kg no período de 15 minutos + 0,017ml/kg/min durante 14 horas).	Observação de rápida melhora clínica nos animais após a administração da ELI; não foram observados efeitos adversos.
<b>Epstein e Hollingsworth (2013); Relato de caso.</b>	Cão	1	- Ivermectina	- ELI 20%, IV (bolus inicial de 1,5ml/kg no período de 10 minutos + 0,25ml/kg/min durante 90 minutos).	Reversão de perda da visão causada pela ivermectina ao término da infusão.
<b>Kuo e Odunayo (2013); Relato de caso.</b>	Gato	2	- Permetrina  - Permetrina	- ELI 20%, IV (bolus inicial de 2,5ml/kg no período de 5 minutos + 0,33ml/kg/min durante 60 minutos). - ELI 20%, IV (bolus inicial de 2,2ml/kg + 0,27ml/kg/min durante 75 minutos). Repetição deste protocolo após 9 e 16 horas.	- Aparente redução no tempo de recuperação e hospitalização de ambos os animais.
<b>Jourdan et al. (2015); Relato de caso.</b>	Gato	20 animais	- Ivermectina (16 animais)  - Ivermectina (4 animais)	- ELI 20%, IV (bolus de 1,5ml/kg). - ELI 20%, IV (bolus inicial de 1,5ml/kg + 0,25ml/kg/min durante 30 minutos). Realizada administração de bolus e infusões adicionais até resolução dos sinais clínicos.	Todos os animais que receberam bolus e infusão contínua antes de manifestarem sintomatologia clínica, permaneceram assintomáticos; dos animais que receberam somente bolus inicial, sem infusão, 36% permaneceram assintomáticos.

### 3.2.5 Efeitos adversos

Efeitos adversos são raros, e podem ocorrer por dois mecanismos: contaminação da solução IV ou reação direta à emulsão. A contaminação, que se torna uma preocupação em produtos ricos em nutrientes, ocorre ao se misturar a emulsão gordurosa à alimentação parenteral. Após manipulação inadequada ou técnica não estéril, a contaminação microbiana pode ocorrer e resultar em infecção local ou sistêmica, e irritação venosa que culmina em tromboflebite. Complicações infecciosas ou por irritação ocorrem raramente quando as ELI são utilizadas sozinhas (Turner-Lawrence e Kerns, 2008).

As reações diretas à ELI são raras, mas incluem a reação colóide, uma reação pirogênica aguda, e a síndrome da sobrecarga gordurosa. Os sinais clínicos da reação pirogênica podem ocorrer 20 minutos após a administração e são semelhantes à reação anafilática, com febre, calafrios, náusea, vômito, dispneia, taquipneia, cianose, arritmias, hipotensão e colapso cardiovascular (Turner-Lawrence, 2008).

A infusão intravascular de uma emulsão instável repleta de grandes glóbulos gordurosos pode levar ao desenvolvimento de uma reação tardia chamada “síndrome da sobrecarga gordurosa”. Neste caso, a remoção metabólica é muito prejudicada, com a possibilidade de obstrução da microvasculatura (Driscoll, 2006). Em humanos, esta síndrome pode resultar em embolismo gorduroso, hiperlipidemia, hepatomegalia, icterícia, esplenomegalia, trombocitopenia, aumento nos tempos de coagulação, hemólise e crises epiléticas (Turner-Lawrence e Kerns, 2008; Fernandez et al., 2011). Estas complicações podem ser observadas quando as ELI são administradas em doses que excedem a capacidade do metabolismo da gordura ou quando o *clearance* plasmático está alterado (Driscoll, 2006; Turner-Lawrence e Kerns, 2008).

Atualmente, houve uma redução nos casos relatados de reações agudas em relação ao tempo de início da utilização das emulsões lipídicas injetáveis. É possível que esta redução seja devido à melhora nas técnicas de produção. Por outro lado, as reações subagudas associadas com a sobrecarga gordurosa ainda são relevantes (Driscoll, 2006).

É possível que as ELI interfiram com outros fármacos administrados durante a terapia, como os anti-epiléticos. Ao se utilizar soluções lipídicas é necessário considerar seu potencial de aprisionar fármacos desejáveis (Gwaltney-Brant e Meadows, 2012).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto experimental foi conduzido após submissão e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo nº 369 / 2014 (Anexo 1). O mesmo também foi aprovado pela Câmara Departamental do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias e pelo Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG).

### 4.1 Animais

Para o presente trabalho era necessária a escolha de uma espécie que apresentasse tamanho mínimo que permitisse a realização de infusão contínua intravenosa e de sucessivas coletas de amostras de sangue. Desta forma, optou-se pela utilização de coelhos.



Foram utilizados 24 coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia pesando aproximadamente 2,5kg, provenientes da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da EV-UFGM, no município de Igarapé. Durante todo o experimento, os animais foram manejados de acordo com os requisitos do CEUA.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Metabolismo e Calorimetria Animal da EV-UFGM em gaiolas metálicas individuais (aproximadamente 75cm de comprimento por 30cm de largura e 45cm de altura). Água e ração comercial para coelhos foram oferecidas *ad libitum*, exceto no dia do experimento, em que os animais eram submetidos a 12 horas de jejum alimentar.

#### 4.2 Escolha da Formulação e Dose

Com o objetivo de simular a ingestão acidental do fármaco, optou-se pela administração do mesmo via sonda nasogástrica. Segundo Bassissi et al. (2006), não existem formulações de ivermectina específicas para coelhos. Coelho et al. (2014) utilizaram uma formulação injetável de ivermectina<sup>1</sup> por via oral com efetividade no tratamento contra *Psoroptes ovis* e *Leporacarus gibbus*. Mellgren e Bergvall (2008) e Al-Azzam et al. (2007) utilizaram, de forma similar, a mesma formulação por via oral no tratamento de parasitoses em coelhos e cães da raça Beagle, respectivamente. Estes relatos demonstram que esta formulação injetável é absorvida quando ingerida.

Ao conhecimento do autor, não existe uma dose tóxica de ivermectina (exposição por ingestão) estabelecida para coelhos. Desta forma, foi necessária a realização de um projeto piloto para determinar qual dose seria utilizada de modo a intoxicar os animais em tempo hábil. No trabalho de Mellgren e Bergvall (2008), foi observado que doses de até 2,7mg/kg, administradas por via oral, se mostraram seguras para coelhos. Estudos teratogênicos em coelhos demonstraram que fêmeas gestantes que receberam diariamente a dose de 6mg/kg por via oral apresentaram sinais de toxicidade somente após 7 dias (Mellgren e Bergvall, 2008). Desta forma, durante o piloto, utilizou-se inicialmente a dose de 8mg/kg, administrada por sonda nasogástrica. Porém, com esta dose, os animais não apresentaram manifestação clínica compatível com intoxicação pelo fármaco. A dose foi então, sucessivamente aumentada. Foi observada manifestação clínica nos animais que receberam a dose de 20mg/kg, porém somente após período superior a doze horas. Por outro lado, os animais que receberam 80mg/kg apresentaram intoxicação clínica até uma hora e meia após a administração da ivermectina. Assim, foi estabelecido que a dose a ser utilizada seria de 80mg/kg, administrada via sonda nasogástrica.

#### 4.3 Preparo dos Animais

Os animais foram contidos com auxílio de uma toalha (Figura 2), de modo a garantir segurança ao animal e àquele que iria manipulá-lo. Com esta técnica foi possível realizar os procedimentos iniciais no animal com redução do estresse gerado ao mesmo.

Depois de adequada contenção, ambas as orelhas foram depiladas na sua face dorsal, como passo inicial da técnica asséptica para colocação dos cateteres para acesso venoso e arterial. Foram utilizados cateteres n<sup>o</sup>22<sup>2</sup>, introduzidos na artéria auricular central direita e na veia auricular marginal esquerda, acoplados à um adaptador PRN<sup>3</sup> e fixados com auxílio de esparadrapo e seringas de 20ml (Figura 3). Para evitar coagulação sanguínea dentro do cateter e,

---

<sup>1</sup> Ivomec® Injetável, Solução de ivermectina 1%, Merial Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Catéter Intravenoso BD Insyte™, Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup> BD PRN Adapter Luer-Lock, Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

consequentemente, inutilização do mesmo, foi administrado 0,5ml de solução heparinizada<sup>4</sup> a 0,1% em cada cateter.



Figura 2: Método de contenção com auxílio de toalha. Após a colocação do animal sobre a toalha, este era envolto por ela, como demonstrado acima (A-D).

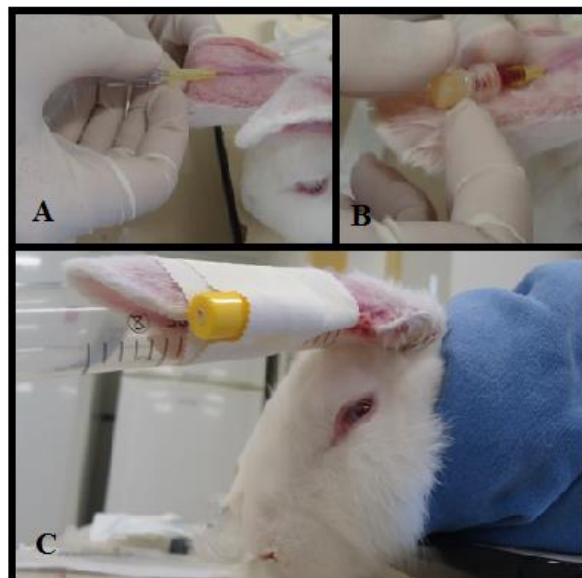


Figura 3. A – Colocação de cateter na artéria auricular. B – Dispositivo PRN acoplado ao cateter na artéria auricular. C – Fixação do cateter acoplado ao PRN na veia auricular marginal.

<sup>4</sup> Solução realizada com heparina sódica Hemofol® 5000UI/ml, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, SP, Brasil, e Cloreto de sódio a 0,9%, Fresenius Kabi Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

Foi realizada, também, sondagem nasogástrica em todos os animais (Figura 4). Para tal, foi aplicado gel de lidocaína a 2%<sup>5</sup> na narina do animal e na sonda. A sonda (sonda uretral n°4<sup>6</sup>) foi marcada de modo a delimitar o quanto esta deveria ser introduzida, compatível com a distância entre a narina e a última costela do animal, estimando-se a posição do estômago. Após delimitação, a sonda foi introduzida no meato nasal, caudal e dorsalmente, até a marcação realizada previamente. Foi certificado de que a sonda encontrava-se no estômago ao se acoplar uma seringa de 20ml à sonda e observar se ao puxar o êmbolo havia vácuo, e também ao introduzir a extremidade externa da sonda em um recipiente com água por alguns segundos. Se fosse observada ausência de vácuo ou produção de bolhas na água, indicativo de localização na traqueia, a sonda era retirada e o procedimento repetido. Caso contrário, era possível afirmar que a sonda se encontrava no estômago.

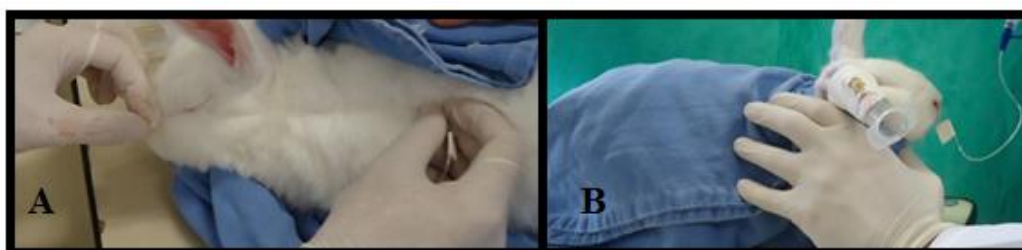


Figura 4: Colocação de sonda nasogástrica. A – Delimitação de quanto a sonda será introduzida (distância da narina até a última costela). B – Coelho com sonda nasogástrica.

Todos os animais foram pesados no dia em que seriam utilizados no experimento em balança digital.

#### 4.4 Tratamentos e Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com seis animais em cada grupo (Tabela 1).

Os animais dos grupos 1, 2 e 3 receberam, via sonda nasogástrica, ivermectina<sup>7</sup> na dose de 80mg/kg de peso vivo (8ml/kg). Os animais do grupo 4 receberam volume equivalente de solução fisiológica<sup>8</sup>. Este momento foi denominado “tempo zero”.

Os animais do grupo 1 não receberam qualquer tratamento posterior à administração da ivermectina. Os tratamentos nos grupos 2, 3 e 4 foram iniciados três horas após a administração da ivermectina ou da solução fisiológica.

O animais do grupo 2 receberam como tratamento a administração IV da solução ringer lactato<sup>9</sup> na dose de 2ml/kg em um período de um minuto, seguido de infusão contínua na taxa de 0,25ml/kg/min durante 60 minutos. Os animais dos grupos 3 e 4 receberam como tratamento a administração da emulsão lipídica<sup>10</sup> via IV na dose de 2ml/kg em um período de um minuto,

<sup>5</sup> Xylestesin®, Cloridrato de Lidocaína, Geleia estéril, 2% (20mg/g), Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, SP, Brasil.

<sup>6</sup> Sonda uretral, Mark Med®, São Paulo, Brasil.

<sup>7</sup> Ivomec® Injetável, Solução de ivermectina 1%, Merial Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil.

<sup>8</sup> Cloreto de sódio a 0,9%, Fresenius Kabi Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

<sup>9</sup> Solução Ringer com Lactato, Fresenius Kabi Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

<sup>10</sup> Lipovenos® 20%, Fresenius Kabi Áustria GmbH, Graz, Áustria.

seguido de infusão contínua na taxa de 0,25ml/kg/min durante 60 minutos com auxílio de bomba de infusão<sup>11</sup>.

Tabela 1: Identificação dos grupos experimentais e seus tratamentos.

Grupo	Identificação	N	Modelo Experimental
1	IV	6	Ivermectina (80mg/kg, via sonda nasogástrica).
2	IV_RL	6	Ivermectina (80mg/kg, via sonda nasogástrica) + Solução Ringer Lactato (2ml/kg em 1 minuto seguido de 0,25ml/kg/min durante 60 minutos, IV).
3	IV_EL	6	Ivermectina (80mg/kg, via sonda nasogástrica) + Emulsão Lipídica (2ml/kg em 1 minuto seguido de 0,25ml/kg/min durante 60 minutos, IV).
4	EL	6	Emulsão Lipídica (2ml/kg em 1 minuto seguido de 0,25ml/kg/min durante 60 minutos, IV).

No tempo 6 horas, os animais foram eutanasiados por sobredose de tiopental<sup>12</sup> (100mg/kg, IV), sendo esta dose referente a três vezes a dose anestésica deste fármaco (Lipman et al., 1997).



Figura 5: Linha de procedimentos. Inicialmente todos os animais foram submetidos à avaliação clínica e coleta de sangue. Em seguida, os animais dos grupos IV, IV\_RL e IV\_EL receberam no tempo zero, por sonda nasogástrica, ivermectina na dose de 80mg/kg de peso vivo (8ml/kg), enquanto os animais do grupo EL receberam o mesmo volume de solução fisiológica. Após esta administração, os animais foram submetidos à novas avaliações clínicas (tempo uma hora e meia, três horas, quatro horas e seis horas) e coletas de sangue (tempo três horas, quatro horas e seis horas). As infusões venosas dos grupos IV\_RL, IV\_EL e EL foram realizadas do momento três a quatro horas. No momento seis horas os animais foram eutanasiados por sobredose de tiopental por via intravenosa (100mg/kg).

#### 4.5 Avaliação Clínica e Neurológica

Todos os animais foram submetidos a exame clínico e neurológico antes do início do experimento (momento zero), e após uma e meia, três, quatro e seis horas. A frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR) foram mensuradas antes da realização de procedimentos que poderiam alterar esses parâmetros por estresse, como colocação do cateter intravenoso ou intra-arterial, sondagem nasogástrica ou realização do exame neurológico. A FC e a FR foram mensuradas por meio de ausculta torácica com auxílio de estetoscópio, e a temperatura retal por meio de termômetro digital.

O exame neurológico consistia de avaliação do estado mental, postura, marcha, nervos cranianos, reações posturais, reflexos miotáticos, tônus muscular, presença de movimentos involuntários, presença de nistagmo espontâneo, capacidade de retornar à posição normal após

<sup>11</sup> Bomba de infusão volumétrica Volumat Agilia Fresenius Kabi Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

<sup>12</sup> Tiopental sódico 1g, Thipentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil.

ser colocado em decúbito dorsal e alteração no padrão respiratório (respiração superficial e abdominal).

Não foi encontrada uma escala de pontuação de alterações neurológicas em coelhos que pudesse ser aplicada aos animais deste experimento. Assim sendo, foi criada uma escala de acordo com as manifestações neurológicas encontradas nos animais intoxicados (Tabela 2). Após a criação desta escala, os animais foram classificados com escores que variavam de 0 a 19. Quanto maior a pontuação encontrada, maior o acometimento da função neurológica do indivíduo.

Tabela 2: Escala de pontuação da avaliação neurológica.

PARÂMETRO CLÍNICO	PONTUAÇÃO
Postura	0 – Normal 1 – Alterada
Estado Mental	0 – Normal 1 – Deprimido 2 – Estupor 3 – Coma
Nervos cranianos	0 – Normais 1 – Déficit
Nistagmo espontâneo	0 – Ausente 1 – Presente
Marcha	0 – Ambulatório; sem alterações 1 – Ambulatório; paresia e/ou ataxia 2 – Não ambulatório
Reações posturais	0 – Normal 1 – Reduzido 2 – Ausente
Tônus	0 – Normal 1 – Reduzido
Reflexos miotáticos	0 – Normal 1 – Reduzido 2 – Ausente
Tremores	0 – Ausente 1 – Presente
Capacidade de retorno à posição normal	0 – Sim; rapidamente. 1 – Sim; de forma lenta. 2 – Não.
Midríase	0 – Ausente 1 – Presente, porém responde à luz 2 – Presente, porém não responde à luz
Alteração Padrão Respiratório	0 – Ausente 1 – Presente

#### 4.6 Coleta e processamento inicial das amostras sanguíneas

As amostras de sangue de todos os animais foram coletadas nos momentos 0, 3, 4 e 6 horas. Em caso de óbito antes do período de 6 horas, a coleta era realizada logo após o óbito. As amostras foram coletadas com seringas de 3ml a partir do acesso fixado na artéria auricular central (Figura 5). Antes de cada coleta, 0,5ml de sangue era descartado devido à administração anterior de solução heparinizada (0,1%).



Figura 6: Coleta de sangue em cateter acoplado a PRN fixado na artéria auricular.

Em seguida, 0,5ml de sangue foi coletado e acondicionado em um microtubo com o anticoagulante<sup>13</sup> EDTA a 10% para realização de hemograma, e 3ml em um tubo sem anticoagulante<sup>14</sup> para posterior obtenção de soro. Os tubos com EDTA a 10% foram homogeneizados cuidadosamente logo após a coleta. Os tubos sem anticoagulante foram deixados em repouso durante 10 minutos e em seguida submetidos à centrifugação a 2683,2G durante oito minutos para obtenção de soro, que foi acondicionado em microtubo e, posteriormente, congelado e armazenado a -20°C durante 90 dias. As amostras de soro foram descongeladas somente no momento das dosagens bioquímicas.

#### 4.7 Hemograma

Para a realização do hemograma, o sangue foi homogeneizado e processado em aparelho hematológico automático<sup>15</sup> que forneceu a maioria dos parâmetros hematológicos (número de hemácias, leucócitos e plaquetas, e dosagem de hemoglobina). Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados imediatamente após a coleta, sendo corados pela técnica de Romanowsky, com utilização do panótico rápido<sup>16</sup>, para posterior análise microscópica, identificação de possíveis alterações celulares e diferenciação de leucócitos. O hematócrito foi realizado pela técnica do microhematócrito (Jain, 1993).

#### 4.8 Avaliação Bioquímica

A análise bioquímica consistiu na avaliação sérica da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), e avaliação da concentração sérica da proteína total, albumina, ureia,

---

<sup>13</sup> Mini Tubo EDTA.K2, Labor Import©, São Paulo, Brasil.

<sup>14</sup> Tubo para sorologia, Vacuette®, Vacuette do Brasil Ltda, Greiner Bio One, São Paulo, Brasil.

<sup>15</sup> Analisador hematológico veterinário Sysmex pocH-100iV Diff @, Sysmex do Brasil Ltda, Paraná, Brasil.

<sup>16</sup> Panótico Rápido – Corante para uso hematológico, Laborclin Ltda, Paraná, Brasil.

creatinina, triglicérides, colesterol e glicose em analisador bioquímico<sup>17</sup> com auxílio de kits comerciais<sup>18</sup>.

As amostras de soro foram descongeladas 15 minutos antes de serem processadas. Para a avaliação da atividade enzimática da ALT, AST, GGT, FA e mensuração da concentração de glicose, proteína total, albumina, ureia e creatinina nas amostras lipêmicas (tempos quatro e seis horas dos grupos IV\_EL e EL), foi necessário descongelá-las 36 horas antes do seu processamento, sendo mantidas até o momento da análise sobre refrigeração. No dia da avaliação bioquímica, o sobrenadante lipêmico foi separado e o restante foi utilizado.

Para a avaliação da concentração sérica de triglicérides e colesterol foi utilizada a amostra integral.

#### **4.9 Análise Toxicológica**

A análise toxicológica foi realizada nos animais dos grupos 1, 2 e 3. Ela consistiu na quantificação da ivermectina encontrada nas amostras teciduais obtidas logo após a eutanásia do animal (hemisfério direito do encéfalo, gordura abdominal, fígado e rim direito). Estas amostras foram mantidas congeladas até o momento de seu processamento.

Para a extração da ivermectina destas amostras foi realizada uma metodologia modificada de QuEChERS (Figura 6) (Anastassiades et al., 2003). O sobrenadante obtido após esta metodologia foi enviado para análise cromatográfica líquida de alta eficiência seguida de espectrometria de massa<sup>19</sup>. As condições cromatográficas sob as quais os extratos foram analisados estão descritas na Tabela 3.

---

<sup>17</sup> Analisador Bioquímico Cobas Mira Plus®, Roche Diagnóstica Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

<sup>18</sup> Kits de Reagentes Bioquímicos Bioclin®, Bioclin/Quibasa, Ltda, Minas Gerais, Brasil.

<sup>19</sup> Espectrômetro LC-MS/MS Triple Quad 5500, Shimadzu, Kyoto, Japão.

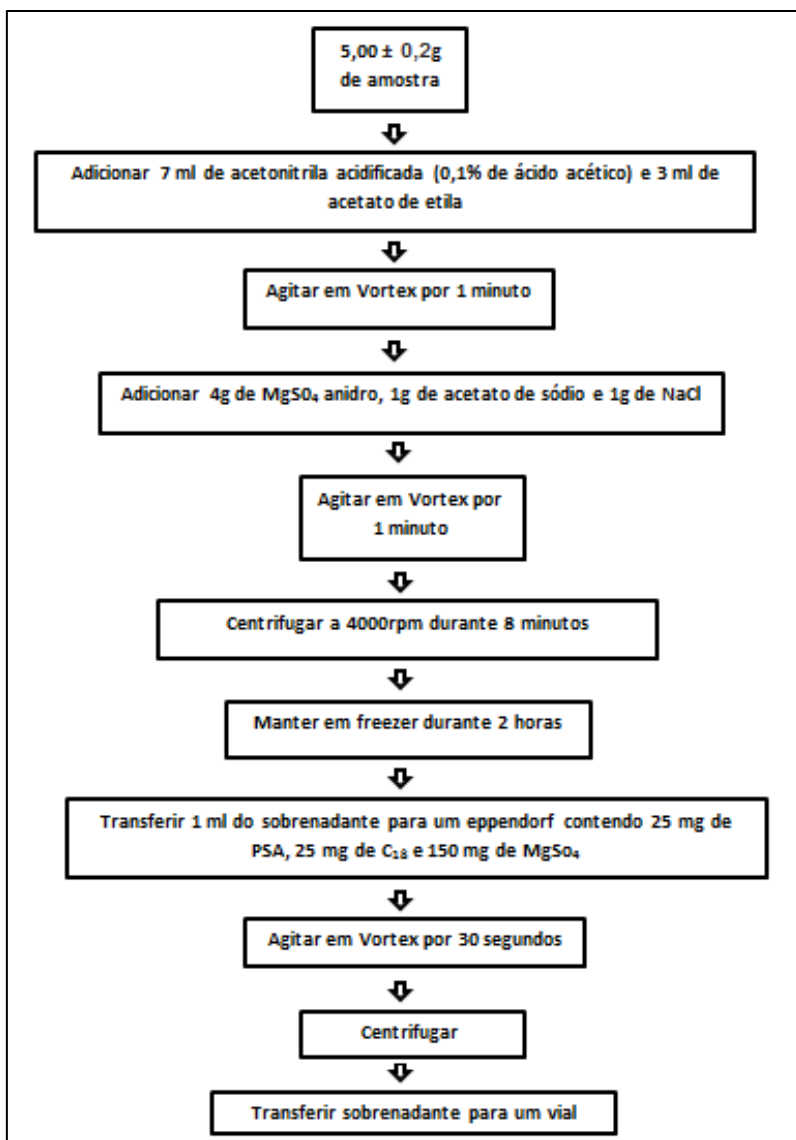


Figura 7: Metodologia adaptada de QuEChERS. Adaptado de Anastassiades et al., 2003.

Tabela 3: Condições cromatográficas.

Parâmetros	Condições otimizadas
Coluna	Zorbax Eclipse XDB C18 1,8 $\mu$ , 2,1 mm x 50 mm
Temperatura da coluna	40 °C
Volume de injeção	10 $\mu$ L
Temperatura do amostrador	20 °C
Posição do "spray" na fonte	Vertical – 5 e horizontal – 5
Fase móvel	Metanol:Tampão acetato de amônio 0,006mMol/L (85:15)
Fluxo	0,5 mL/min
Tempo de corrida	5 min

Fonte: CL-EM/EM API5000



#### **4.10 Avaliação macroscópica e histopatológica**

A necropsia foi realizada logo após o óbito ou eutanásia do animal, sendo avaliada a presença de alterações macroscópicas. Foram coletados fragmentos de coração (ventrículo, englobando epicárdio, miocárdio e endocárdio), baço, fígado, encéfalo (hemisfério esquerdo) e rim esquerdo, os quais foram fixados em formalina 10% neutra e tamponada e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Em seguida, secções histológicas de 4µm foram obtidas e coradas por hematoxilina e eosina (HE), e as lâminas foram avaliadas para análise histopatológica em microscópio de luz branca.

#### **4.11 Estatística**

O experimento foi conduzido de acordo com os princípios básicos da experimentação animal: repetição de unidades experimentais, casualização das unidades experimentais, uniformidade dos animais experimentais, uniformidade na aplicação dos tratamentos e uniformidade do meio (Sampaio, 2010).

O número de animais escolhido foi o número mínimo necessário para que se realize um estudo estatístico adequado. Para a sua determinação, foi utilizado o parâmetro frequência respiratória e a fórmula de Sampaio (2010) para cálculo do tamanho da amostra ( $x=t.s/\sqrt{r}$ ), sendo r o número de animais de cada grupo. Segundo Barbosa et. al (1992), a frequência respiratória de coelhos adultos varia de 152 a 220 movimentos por minuto (mpm). Ao considerar a média igual a 186mpm, e uma variação aceitável de 15% (que corresponde a 27,9), através da formula citada acima se tem que:  $27,9=2x34/\sqrt{r}$ . Desta forma,  $r=5,92$ , e cada grupo foi composto por seis animais.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com parcelas subdividas, sendo o tratamento considerado as parcelas e os diferentes tempos as subparcelas.

Para a análise estatística das variáveis paramétricas foi utilizado ANOVA com teste de Tukey. As variáveis que apresentaram elevado desvio padrão foram submetidas, previamente, a transformação logarítmica 10.

As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre diferentes níveis e pelo teste de Friedman para a comparação entre os diferentes tempos.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Análises Clínicas**

As manifestações neurológicas foram as principais ocorrências clínicas nos grupos dos animais intoxicados (Tabela 4), assim como relatado por Jourdan e colaboradores (2015).

Tabela 4: Frequência das alterações clínicas observadas nos animais intoxicados por ivermectina na dose de 80mg/kg (VO).

Alteração Clínica	Número de Animais n=18 (100%)
Midríase	18 (100%)
Alteração no estado mental	18 (100%)
Déficit em nervos cranianos	18 (100%)
Alteração nas reações posturais	18 (100%)
Paresia ou paralisia	15 (83,3%)
Alteração na postura	14 (77,8%)
Alteração no padrão respiratório	13 (72,2%)
Bradipneia	13 (72,2%)
Hipotermia	12 (66,7%)
Ataxia	9 (50,0%)
Redução no tônus muscular	8 (44,4%)
Nistagmo espontâneo	5 (27,8%)
Alteração reflexos miotáticos	3 (16,7%)
Tremores	3 (16,7%)
Bradycardia	2 (11,0%)

### 5.1.1 Frequência Cardíaca, Frequência Respiratória e Temperatura Retal

Os valores fisiológicos de frequência cardíaca e respiratória, e temperatura retal estão expostos na tabela 5. Não foi observada diferença estatística entre os tempos do grupo IV (Tabela 6). Deste modo, é possível concluir que a ivermectina não causa alteração na frequência cardíaca (FC) dos animais intoxicados. Não houve, também, diferença estatística entre os grupos IV, IV\_RL e IV\_EL, o que demonstra que os diferentes tratamentos não alteram a FC. Da mesma forma, a ausência de variação significativa entre os diferentes tempos no grupo EL confirma que a ELI não resulta em alterações na FC.

Tabela 5: Valores fisiológicos normais de frequência cardíaca (batimentos por minuto), frequência respiratória (movimentos por minuto) e temperatura retal (°C) para coelhos.

Parâmetro Clínico	Valor de referência
Temperatura Retal	38,5° – 40 °C <sup>a</sup>
Frequência Cardíaca	180 – 250 bpm <sup>a</sup>
Frequência Respiratória	152 – 220 mpm <sup>b</sup>

Fontes: <sup>a</sup> Donnelly (1997); <sup>b</sup> Barbosa et al. (1992).

Tabela 6: Valores médios e desvio padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas)	Grupos			
	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	211,33±30,51 Aa	215,33±26,82 Aa	213,33±14,68 ABa	190,00±34,85 Aa
1,5	245,60±17,57 Aab	260,80±17,30 Ab	259,33±22,40 Bb	194,66±12,04 Aa
3	227,20±38,41 Aa	226,67±55,23 Aa	244,00±26,08 ABa	198,66±13,06 Aa
4	192,00±72,17 Aa	197,33±81,34 Aa	219,20±37,03 Aa	194,00±30,22 Aa
6	230,00±44,36 Aa	252±10,83 Aa	201,60±38,12 ABa	227,33±60,31 Aa

\* Para avaliação estatística os dados foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

De acordo com os dados obtidos, foi possível observar dentro do grupo IV uma redução significativa gradual da frequência respiratória (FR) (Tabela 7), sendo que a partir do tempo três horas esta se encontrava abaixo do considerado normal para a espécie (Tabela 5). Este mesmo fato pode ser observado nos grupos IV\_RL e IV\_EL, sem diferença estatística entre estes três grupos. A ivermectina causa, desta forma, redução na FR dos animais intoxicados, e os tratamentos instituídos não alteraram significativamente esta manifestação clínica. A equivalência entre os valores obtidos nos diferentes tempos dentro do grupo EL (Tabela 7) demonstra que a infusão de ELI não causou alterações na FR dos animais.

Tabela 7: Valores médios e desvio padrão da frequência respiratória (movimentos por minuto) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	192,66±47,02 BCa	204,66±21,08 Ba	206,00±54,18 Ca	188,00±37,52 Aa
1,5	215,20±69,82 Ca	159,20±49,83 ABa	172,00±58,57 BCa	210,67±26,37 Aa
3	134,40±70,74 ABab	125,33±42,68 Aa	120,00±55,24 ABa	209,33±35,66 Ab
4	117,60±83,36 Aa	96,00±35,68 Aa	99,2,66±38,51 Aa	230,67±19,87 Ab
6	85,00±16,12 Aa	93,00±14,74 Aa	96,00±22,8 Aa	197,33±32,17 Ab

\* Para avaliação estatística os dados foram analisados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

De forma similar à avaliação da FR, foi possível observar redução gradual da temperatura retal (TR) no grupo IV, assim como não houve diferença estatística entre os grupos de animais intoxicados que receberam tratamento (IV\_RL e IV\_EL) e o que não recebeu (IV) (Tabela 8). Em todos os grupos que receberam ivermectina, a partir do tempo três horas é possível observar que os animais apresentaram TR abaixo do considerado normal para a espécie (Tabela 5). Conclui-se que a administração de ivermectina em altas doses causou redução da TR dos animais, e os tratamentos instituídos não alteraram, durante o período observado, esta manifestação e sua progressão. Estes achados condizem com o exposto pela literatura, que relata que a intoxicação por ivermectina pode causar hipotermia nos animais acometidos (Kidwell et al., 2014). A observação de ausência de variação dentro do grupo EL demonstra que a administração de ELI não interfere significativamente na TR dos animais.

Tabela 8- Valores médios e desvio padrão da temperatura retal ( $^{\circ}\text{C}$ ) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	39,06±0,55 Ca	39,18±0,35 Ba	38,98±0,29 Ca	38,87±0,45 Aa
1,5	38,50±0,45 BCa	38,92±0,49 Ba	38,62±0,43 BCa	39,26±0,36 Aa
3	37,84±0,73 ABab	38,21±0,62 ABab	38,04±0,51 ABa	39,01±0,47 Ab
4	37,50±1,16 ABa	37,65±1,32 Aa	37,82±0,43 Aa	39,36±0,54 Ab
6	37,02±0,87 Aa	37,82±0,87 Aa	37,42±0,77 Aa	39,62±0,66 Ab

\* Para avaliação estatística os dados foram analisados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

As alterações na frequência respiratória e na temperatura retal podem ser justificadas pelo fato destes parâmetros serem controlados no encéfalo pelo centro respiratório no bulbo e pelo hipotálamo, respectivamente (Fernández e Bernardini, 2010). Desta forma, ao considerarmos que na intoxicação por ivermectina este fármaco penetra no encéfalo, e sua distribuição é favorecida dentro deste órgão pelo seu alto conteúdo lipídico (Dorman, 2006), é possível que ela atue também no bulbo e hipotálamo.

### 5.1.2 Avaliação Neurológica

Assim como o apresentado pela literatura, as manifestações mais frequentes nos animais intoxicados pela ivermectina foram: alterações no estado mental (Figura 8), déficits em nervos cranianos, ataxia, paresia e alterações proprioceptivas. Outros sinais como nistagmo, tremores, e alterações no padrão respiratório também ocorrem (Pulliam e Preston, 1989; Lankas et al., 1997; Dadarkar et al., 2007; Hopper et al., 2002; Nelson et al., 2003; Roulet et al., 2003; Merola et al., 2009; Bruenisholz et al., 2012; Ménez et al., 2012; Bates et al., 2013; Jourdan et al., 2015).

Em consonância com os relatos de Lankas e Gordon (1989) e Jourdan et al. (2015) a midríase (Figura 9) ocorreu em todos os animais intoxicados (Tabela 4), e foi o primeiro sinal clínico manifestado. Por outro lado, esta ocorrência foi mais elevada do que a observada por Merola et al. (2009) e Hopper et al. (2002), que relatam 22% e 40 a 83%, respectivamente.

As alterações observadas durante a avaliação dos nervos cranianos foram redução da resposta à ameaça, do reflexo pupilar a luz, da sensibilidade facial, do nistagmo fisiológico, do reflexo

corneano e do reflexo palpebral. Estes déficits, em conjunto às alterações do estado mental e da locomoção, e déficits posturais e proprioceptivos foram compatíveis com lesão em tronco encefálico (Vernau et al., 2007; Thomson e Hahn, 2012).

No presente experimento foi observada redução no tônus muscular e alterações nos reflexos miotáticos, caracterizadas por redução nos reflexos de retirada e patelar, em alguns animais. Estas alterações, características de lesão em neurônio motor inferior (NMI) (Dewey, 2006; Thomson e Hahn, 2012) não são comumente relatadas como manifestações da intoxicação pela ivermectina.



Figura 8: Avaliação do estado mental. O animal do lado esquerdo, pertencente ao grupo EL, apresentava estado mental normal, estava alerta, responsivo, explorando o ambiente. Por outro lado, o animal à direita, do grupo IV, apresentava-se em estupor, respondendo somente à estímulos nocivos.



Figura 9: Ocorrência de midríase em um animal do grupo IV\_EL.

A disfunção do NMI pode ocorrer devido a dano na região do SNC onde o seu corpo celular está localizado, na região das intumescências cervical e lombar, ou devido a dano ao axônio no sistema nervoso periférico (Thomson e Hahn, 2012). Enquanto no encéfalo o principal neurotransmissor inibitório é o GABA, na medula espinhal a glicina apresenta esta função (Johnson, 2012). Para que a lesão causada apresente localização nas intumescências, é necessário envolvimento da glicina. Trailovic e Varagi (2007) sugerem que a ivermectina pode interagir, direta ou indiretamente, com os receptores de glicina. Desta forma, é possível que as

manifestações de NMI encontradas no presente experimento sejam decorrentes de acometimento nervoso central medular, com ação da ivermectina sobre os receptores de glicina.

Por outro lado, Magnaghi et al. (2008) observaram em camundongos que a ausência genética e funcional de receptores GABA<sub>B</sub> alterou a mielinização de fibras nervosas periféricas. Este achado sugere que os receptores de GABA podem, ao contrário do que havia sido previamente estabelecido, estar presentes no SNP. Sung et al. (2009) relatam a ocorrência de polineuropatia em um homem após a ingestão de dose alta de avermectina (414mg/kg) e intoxicação grave. Com base neste relato, é possível que a disfunção em NMI tenha ocorrido pelo envolvimento do SNP nas intoxicações pela ivermectina. É importante ressaltar que o sistema nervoso apresenta alto conteúdo lipídico, o que pode favorecer a distribuição da ivermectina por toda a sua extensão (Dorman, 2006).

A comparação da manifestação clínica entre os diferentes grupos e tempos foi baseada na escala de pontuação de alterações neurológicas criada (Tabela 2). No tempo zero não houve diferença significativa entre os grupos, uma vez que nenhum dos animais utilizados durante o experimento apresentava alteração neurológica antes dos procedimentos serem iniciados (Tabela 9). Uma vez que no grupo IV foi possível observar aumento estatisticamente relevante da pontuação neurológica após a administração da ivermectina, pode-se afirmar que este fármaco, na dose utilizada, causou alterações neurológicas nos animais utilizados. Não houve diferença, porém, entre os grupos IV, IV\_RL e IV\_EL, o que demonstra que os tratamentos instituídos não impediram a manifestação ou reverteram as alterações causadas (Tabela 9). Não houve qualquer variação dentro do grupo EL, o que comprova que a ELI não causou alterações neurológicas nos animais.

Tabela 9 - Valores médios da pontuação neurológica nos diferentes grupos e tempos avaliados

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
1,5	7,40 Bb	3,00 ABab	5,17 BCab	0,00 Aa
3	8,40 Bb	7,33 Bb	9,80 BCb	0,00 Aa
4	9,40 Bb	8,60 Bb	10,40 BCb	0,00 Aa
6	9,75 Bb	9,00 Bb	11,80 Cb	0,00 Aa

\*Avaliação estatística realizada pelo teste de Kruskal Wallis para nível e de Friedman para tempo ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Jourdan et al. (2015) sugeriram que o tratamento da intoxicação por ivermectina com a utilização das emulsões lipídica intravenosas não apresenta efeito sobre a duração da intoxicação em gatos com intoxicação grave. É possível, desta forma, que o fato de não ter ocorrido melhora clínica no presente estudo com esta terapia pode ser devido à gravidade da intoxicação. Outra possibilidade é de que um período de monitoração maior seria necessário para que fosse possível verificar a melhora clínica destes animais, uma vez que as alterações neurológicas foram graves e podem requerer um tempo maior para serem revertidas.

## 5.2 Hemograma

### 5.2.1 Eritrograma

Nos esfregaços sanguíneos não foram observadas quaisquer alterações morfológicas em hemácias. Os valores de referência dos parâmetros eritrocitários para coelhos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de referência dos parâmetros eritrocitários para coelhos.

Parâmetros Eritrocitários	Valor de Referência
Eritrócitos ( $\times 10^9/\mu\text{L}$ )	5,2 – 6,8
Hemoglobina (g/dL)	11,5 – 15,1
Volume Globular (%)	36,6 – 47,4
CHCM (g/dL)	29,5 – 33,9
VCM (fL)	64,6 – 76,2

Fontes: Campbell (2007a).

A contagem de eritrócitos não variou significativamente dentro do grupo IV (Tabela 11). Estes achados sugerem que a intoxicação pela ivermectina não apresenta efeito sobre a contagem de eritrócitos.

Os grupos que receberam infusões de ringer lactato ou ELI apresentaram diferença significativa entre os tempos zero e seis horas, com menor contagem de eritrócitos no último momento (Tabela 11). Este efeito pode ser justificado pela hemodiluição gerada pela infusão realizada (Fettman, 2007; Tvedten, 2010). É importante ressaltar que todos os valores encontrados estavam dentro dos limites estabelecidos para a espécie (Tabela 10).

Tabela 11 - Valores médios e desvio padrão da contagem de eritrócitos ( $\times 10^6$  céls/ $\mu$ L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas)	Grupos			
	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	6,45 $\pm$ 0,51 Aa	6,13 $\pm$ 0,20 Aa	6,16 $\pm$ 0,59 Aa	6,53 $\pm$ 0,99 Aa
3	5,98 $\pm$ 0,31 Aa	5,93 $\pm$ 0,32 Aa	6,27 $\pm$ 0,86 Aa	5,85 $\pm$ 0,49 ABa
4	6,01 $\pm$ 0,45 Aa	5,66 $\pm$ 0,16 Ba	5,66 $\pm$ 0,60 ABa	5,48 $\pm$ 0,33 Ba
6	5,83 $\pm$ 0,49 Aa	5,60 $\pm$ 0,23 Ba	5,45 $\pm$ 0,65 Ba	5,61 $\pm$ 0,33 Ba

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Durante a avaliação da concentração de hemoglobina (Tabela 12) foi observada diferença estatística entre o tempo zero e seis horas no grupo IV, a qual demonstra que a ivermectina causou uma redução deste valor. Seri et al. (2001b) relatam, também, uma redução deste parâmetro em camelos que receberam ivermectina em dose terapêutica única. Existem relatos, em humanos, de hipotensão arterial em casos de intoxicação grave por avermectinas, como a ivermectina (Merck et al., 1985 apud Hall et al., 1985; De Sole et al., 1989; Chung et al., 1999). A hipotensão induz ao movimento de líquido extracelular do espaço extravascular para o intravascular, e este desvio resulta em uma diluição do eritrócito e das proteínas plasmáticas (Stockham e Scott, 2008a). Desta forma, é possível que a redução na concentração de hemoglobina observada no grupo IV seja decorrente de uma queda na pressão sanguínea, porém este parâmetro não foi avaliado durante o experimento. Outra possibilidade é de que esta redução tenha ocorrido devido às sucessivas administrações de solução heparinizada após as coletas de sangue em associação à retirada de sangue durante estas coletas. Após perdas de sangue, o organismo tenta compensar esta alteração, de forma similar ao citado para a hipovolemia, transferindo fluido intersticial ao sangue (Thrall, 2007), e a administração de fluidos intravenosos também pode resultar em um efeito diluidor (Fettman, 2007; Tvedten, 2010). É importante ressaltar que apesar de ter ocorrido esta redução da concentração de hemoglobina, esta continuou dentro da faixa de normalidade para a espécie (Tabela 10). No grupo IV\_RL foi observada, também, redução da concentração de hemoglobina, porém esta pode ser justificada pela diluição causada pela infusão de Ringer Lactato (Fettman, 2007; Tvedten, 2010).

Nos tempos quatro e seis horas, é possível observar diferença entre os grupos que não receberam a ELI (IV e IV\_RL) e os que a receberam (IV\_EL e EL). Os últimos apresentaram valores mais altos de hemoglobina. Nos grupos IV\_EL e EL é observada diferença significativa entre os tempos três e seis horas, com aumento no valor da concentração da hemoglobina, inclusive com valores acima dos valores de referência de normalidade (Tabela 10 e Tabela 12). A concentração de hemoglobina pode ser superestimada na presença de corpúsculos de Heinz (os quais não foram observados no presente caso), hemólise e lipemia (Paes et al., 2009). Desta forma, é provável que a lipemia destas amostras tenha prejudicado a obtenção do valor real deste parâmetro. A determinação da concentração de hemoglobina é realizada por espectrofotometria por métodos colorimétricos, sendo que a lipemia irá interferir na cor obtida aumentando falsamente sua intensidade. Outra possibilidade é de que a ELI tenha causado

hemólise nestes animais, porém não foi observada hemólise intensa na avaliação do plasma dos animais.

Tabela 12- Valores médios e desvio padrão da concentração de hemoglobina (g/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	13,48±0,46 Aa	12,27±0,54 Aa	12,57±0,98 Ba	13,67±1,96 Ca
3	12,60±0,79 ABa	11,90±0,91 Aa	12,80±1,14 Ba	12,10±0,91 Ca
4	12,46±0,82 ABb	11,02±0,44 Bb	22,48±7,00 Aa	21,38±2,72 Aa
6	12,15±0,99 Bb	10,75±0,46 Bb	20,96±7,88 Aa	16,08±1,90 Ba

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Durante a avaliação do volume globular (VG) (Tabela 13) foi observada diferença significativa entre os valores obtidos no tempo zero e no tempo seis horas do grupo IV. Esta redução também foi observada em camelos que receberam dose terapêutica de ivermectina, apesar de se manter dentro do valor de referência para a espécie (Seri et al., 2001b). De forma similar ao discutido anteriormente durante a avaliação da concentração de hemoglobina, este fato pode ser justificado por uma possível hipotensão causada pela ivermectina (Stockham e Scott, 2008a), pela administração de solução heparinizada (Fettman, 2007; Tvedten, 2010) e/ou devido às coletas de sangue (Thrall, 2007).

A redução gradual do VG nos grupos IV\_RL e EL provavelmente ocorreu devido à hemodiluição pelas infusões realizadas (Fettman, 2007; Tvedten, 2010). Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos instituídos (grupos IV\_RL e IV\_EL).

Tabela 13 - Valores médios e desvio padrão do volume globular (%) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	41,83±2,64 Aa	39,67±1,37 Aa	40,50±2,66 Aa	40,33±1,75 Aa
3	40,60±2,07 ABa	37,83±2,71 ABa	40,33±4,32 Aa	38,83±1,94 Aa
4	39,80±2,28 ABa	35,50±1,29 BCb	38,00±3,80 Aab	35,50±0,55 Bb
6	37,75±1,89 Ba	34,50±1,29 Ca	37,20±2,77 Aa	36,50±2,43 Ba

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Ao se avaliar a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi observada diferença significativa entre os grupos que não receberam ELI (IV e IV\_RL) e os que receberam (IV\_EL e EL) (Tab.14). Esta variação ocorreu, também, dentro dos grupos IV\_EL e EL ao se comparar os valores obtidos antes da infusão (tempo zero e três horas) e após a mesma (tempo quatro e seis horas). A CHCM é obtida a partir da concentração de hemoglobina ([Hb]) e do volume globular (VG) pela fórmula  $CHCM(g/dL)=[Hb](g/dL)\times 100/VG(\%)$  (Paes et al., 2009). Desta forma, alterações na concentração de hemoglobina ou no volume globular alteram a CHCM encontrada, e a diferença encontrada pode ser justificada pelas alterações na concentração de hemoglobina definidas previamente.

Tabela 14 - Valores médios e desvio padrão da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	32,35±2,47 Aa	30,95±1,38 Aa	31,03±0,95 Aa	33,80±3,46 Aba
3	31,02±0,66 Aa	31,47±0,60 Aa	31,78±1,13 Aa	31,17±1,50 Aa
4	31,30±0,73 Aa	31,07±0,34 Aa	58,56±15,72 Bb	60,20±7,30 Cb
6	32,17±1,72 Aa	31,15±0,45 Aa	55,96±20,14 Bb	44,08±4,53 BCb

\*Avaliação estatística realizada pelo teste de Kruskal Wallis para nível e de Friedman para tempo (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

É evidenciado que não houve variação entre os grupos, e nem mesmo dentro de cada grupo, durante a avaliação do volume corpuscular médio (VCM) (Tabela 15). Desta forma, pode-se afirmar que o VCM não foi alterado pela intoxicação por ivermectina e pelos tratamentos instituídos.

Tabela 15- Valores médios e desvio padrão do volume corpuscular médio (VCM) (fL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	65,23±6,17 Aa	64,68±1,98 Aa	65,92±2,53 Aa	62,57±6,59 Aa
3	67,96±3,38 Aa	63,73±1,64 Aa	64,57±2,60 Aa	66,65±5,36 Aa
4	66,38±4,29 Aa	62,77±2,62 Aa	67,22±2,21 Aa	65,02±4,75 Aa
6	64,97±3,82 Aa	61,57±1,36 Aa	68,68±6,25 Aa	65,08±3,06 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

## 5.2.2 Leucograma

Nos esfregaços sanguíneos não foram observadas quaisquer alterações morfológicas em leucócitos. Os valores de referência dos parâmetros leucocitários para coelhos são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Valores de referência dos parâmetros leucocitários para coelhos.

Parâmetros Leucocitários	Valor de Referência
Leucócitos totais ( $\mu\text{L}$ )	6.300 – 10.060
Neutrófilos segmentados ( $\mu\text{L}$ )	1.490 – 3.210
Bastonetes ( $\mu\text{L}$ )	0
Linfócitos ( $\mu\text{L}$ )	3.360 – 7.000
Monócitos ( $\mu\text{L}$ )	50 – 450
Eosinófilos ( $\mu\text{L}$ )	10 – 150
Basófilos ( $\mu\text{L}$ )	60 – 360

Fonte: Campbell (2007a).

Não houve diferença significativa na leucometria total entre os grupos nos tempos zero, três e quatro horas (Tabela 17). Esta observação sugere que os diferentes tratamentos instituídos não interferiram sobre a contagem total de leucócitos dos animais nestes momentos.

No tempo seis horas, por outro lado, é observada variação entre o grupo IV e os grupos IV\_RL e IV\_EL, em que os últimos apresentam maior contagem total de leucócitos em relação ao primeiro. Não existe, porém, diferença significativa entre os grupos IV\_RL e IV\_EL. Dentro dos grupos IV, IV\_RL e EL houve variação na leucometria nos diferentes tempos, porém não foi observada variação significativa entre os tempos zero e seis horas. Variações na contagem total de leucócitos em 15 a 30% podem ocorrer devido ao estresse sobre o qual o animal é submetido durante a coleta (Campbell, 2007a). Desta forma, as variações dentro dos grupos entre os diferentes tempos podem ser devido ao estresse.

Tabela 17- Valores médios e desvio padrão da contagem total de leucócitos ( $\mu\text{L}$ ) nos diferentes grupos e tempos avaliados

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	7392,17±1568,16 Ca	7840,83±2404,99 Ba	8075,67±2140,37 Aa	8516,67±2332,74 ABa
3	10740,00±2539,29 Aa	12533,33±3294,03 Aa	12146,83±5518,26 Aa	11466,67±2411,36 Aa
4	9160,00±2472,45 ABa	10875,00±2269,18 ABa	10957,60±4591,47 Aa	7457,33±3707,36 Ba
6	7850,00±2361,50 BCb	12150,00±2212,84 ABa	12300,00±2890,50 Aa	9400,00±1369,67 ABab

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.



A proporção neutrófilos:linfócitos, a contagem absoluta de neutrófilos e de linfócitos parecem ser mais confiáveis que a contagem leucocitária total durante a avaliação do leucograma (Campbell, 2007a).

Dentro de cada grupo, foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tempos. Todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa entre o tempo zero e o três horas, com maior contagem de neutrófilos segmentados no segundo momento e menor contagem de linfócitos, exceto o grupo IV\_RL, em que houve redução no tempo quatro horas.

A variação observada na contagem de neutrófilos e linfócitos pode ser justificada pelo estresse ao qual os animais foram submetidos. Os linfócitos são os leucócitos predominantes em coelhos, porém a proporção neutrófilos:linfócitos (N:L) pode ser alterada pela idade, método de contenção e de coleta de sangue. O aumento sérico de cortisol, como o que ocorre durante o estresse, pode causar inversão da proporção N:L (Campbell, 2007a). El-Far (2013) e Sadek e Shaheen (2015) relatam aumento do cortisol sérico após a administração de ivermectina em ratos e vacas, respectivamente. Com base nos dados obtidos, é possível observar justamente esta inversão na proporção entre estes tipos celulares (Tabela 18 e Tabela 19).

Não houve variação, porém, na contagem de neutrófilos segmentados e de linfócitos entre os grupos em todos os tempos, o que sugere que os tratamentos instituídos não alteram estes parâmetros.

Tabela 18- Valores médios e desvio padrão da contagem de neutrófilos segmentados ( $\mu\text{L}$ ) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas)	Grupos			
	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	3938,33 $\pm$ 1108,13 Ca	3053,78 $\pm$ 1022,13 Ba	3868,68 $\pm$ 1347,74 Ba	3858,00 $\pm$ 1383,74 Ba
3	7137,80 $\pm$ 2654,22 Aa	7458,50 $\pm$ 2359,02 Aa	8342,97 $\pm$ 4330,73 Aa	7391,50 $\pm$ 2528,83 Aa
4	6284,00 $\pm$ 2385,49 ABa	6544,00 $\pm$ 1261,75 Aa	6853,76 $\pm$ 2973,60 ABa	4215,35 $\pm$ 2648,77 Ba
6	5580,25 $\pm$ 2577,99 Ba	8272,75 $\pm$ 3248,84 Aa	8013,80 $\pm$ 1932,89 ABa	5633,83 $\pm$ 765,90 ABa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Tabela 19- Valores médios e desvio padrão da contagem de linfócitos ( $\mu\text{L}$ ) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas)	Grupos			
	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	2924,17 $\pm$ 775,15 Ca	4440,10 $\pm$ 1895,58Ba	3709,43 $\pm$ 973,92 Ba	4211,67 $\pm$ 1164,03 Ba
3	2790,20 $\pm$ 1418,85 Aa	4511,33 $\pm$ 1456,86 Aa	3069,17 $\pm$ 1718,83 Aa	3434,67 $\pm$ 956,22 Aa
4	2432,00 $\pm$ 604,29 ABa	3894,00 $\pm$ 883,90 Aa	3520,50 $\pm$ 1675,27 ABa	2988,22 $\pm$ 1201,16 Ba
6	1830,25 $\pm$ 390,04 Ba	3460,00 $\pm$ 1065,46 Aa	3843,40 $\pm$ 1900,84 ABa	3568,17 $\pm$ 1253,55 ABa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

A contagem de monócitos não variou entre os grupos, e nem mesmo dentro de cada grupo (Tabela 20). A intoxicação pela ivermectina e os tratamentos instituídos não tiveram influência sobre a contagem destas células.

Tabela 20- Valores médios e desvio padrão da contagem de monócitos ( $\mu\text{L}$ ) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas)	Grupos			
	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	502,50 $\pm$ 206,77 Aa	287,57 $\pm$ 129,16 Aa	432,65 $\pm$ 126,79 Aa	377,00 $\pm$ 207,37 Aa
3	718,80 $\pm$ 503,90 Aa	437,00 $\pm$ 215,29 Aa	670,37 $\pm$ 415,59 Aa	550,33 $\pm$ 352,54 Aa
4	444,00 $\pm$ 222,56 Aa	406,25 $\pm$ 304,70 Aa	549,32 $\pm$ 406,93 Aa	224,43 $\pm$ 169,15 Aa
6	419,75 $\pm$ 202,46 Aa	353,75 $\pm$ 62,59 Aa	388,60 $\pm$ 280,81 Aa	168,00 $\pm$ 126,51 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Bastonetes, basófilos e eosinófilos foram observados de forma esporádica, sem diferença significativa entre os grupos e os tempos.

### 5.2.2 Plaquetas

Nos esfregaços sanguíneos não foram observadas quaisquer alterações morfológicas em plaquetas. Em coelhos normais, a contagem total de plaquetas varia de 250 – 610 x10<sup>3</sup> céls/ µL (Campbell, 2007a).

Foi evidenciado que não houve variação entre os grupos, e nem mesmo dentro de cada grupo, durante a avaliação da contagem de plaquetas (Tabela 21). Desta forma, pode-se afirmar que esta contagem não foi alterada pela intoxicação por ivermectina, pelos tratamentos instituídos e não houve variação associada ao tempo transcorrido desde o início dos procedimentos.

Tabela 21- Valores médios e desvio padrão da contagem de plaquetas (x10<sup>3</sup>/µL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas)	Grupos			
	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	380,67±93,79 Aa	308,70±145,50 Aa	346,33±42,17 Aa	261,67±57,56 Aa
3	375,20±71,82 Aa	334,17±90,42 Aa	343,80±45,85 Aa	275,00±57,79 Aa
4	359,00±61,09 Aa	303,25±35,78 Aa	310,00±72,93 Aa	219,33±134,56 Aa
6	347,00±39,13 Aa	260,25±162,75 Aa	283,00±121,82 Aa	246,33±86,14 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

### 5.3 Análises Bioquímicas

O descongelamento e manutenção sobre refrigeração das amostras lipêmicas 36 horas antes do seu processamento, e a separação do sobrenadante no dia da avaliação bioquímica foram realizados como tentativa de reduzir a lipemia das amostras e evitar a interferência na avaliação da concentração de glicose, proteína total, albumina, ureia e creatinina, e da atividade de ALT, AST, FA e GGT. Para avaliação da concentração sérica de triglicérides e colesterol se utilizou a amostra na íntegra, pois era provável que este preparo prévio provocasse alterações nos resultados obtidos, uma vez que ambos são lipofílicos.

Os valores de referência dos parâmetros bioquímicos para coelhos são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Valores de referência dos parâmetros bioquímicos para coelhos.

Parâmetros Bioquímicos	Valor de Referência
Ureia (mg/dL)	47,3 – 57,7 <sup>c</sup>
Creatinina (mg/dL)	0,8 – 2,9 <sup>a</sup>
ALT (UI/L)	< 100 <sup>a</sup>
AST (UI/L)	< 100 <sup>a</sup>
GGT (UI/L)	0 – 14 <sup>b</sup>
FA (UI/L)	121 – 145 <sup>c</sup>
Glicose (mg/dL)	89 – 144 <sup>a,c</sup>
Triglicérides (mg/dL)	72 - 90 <sup>c</sup>
Colesterol (mg/dL)	58,5 – 84,2 <sup>c</sup>
Proteína Total (mg/dL)	5 – 8,5 <sup>a</sup>
Albumina (mg/dL)	3 – 3,34 <sup>a</sup>

Fontes: <sup>a</sup> Campbell (2007b); <sup>b</sup> Hewitt et al. (1989); <sup>c</sup> Spinelli et al., 2012.

#### 5.3.1 Ureia e Creatinina

Durante a avaliação da concentração sérica de ureia (Tabela 23) foi possível observar aumento deste analito em todos os grupos. Arise and Malomo (2009) e Elzoghby et al. (2015) citam aumento da ureia sérica após a administração crônica de ivermectina em ratos. El-Far (2013)

cita esta mesma alteração após a administração de 0,2mg/kg (dose terapêutica) e 0,4mg/kg deste fármaco em coelhos, fato também observado em um leão intoxicado (Sadiq et al., 2015). Estes aumentos, porém, tendiam a se normalizar alguns dias após a exposição (Elzoghby et al, 2015; Sadiq et al., 2015). É importante ressaltar que no caso relatado por Sadiq et al. (2015), o animal envolvido estava desidratado. Estes autores sugerem que a ivermectina causou, mesmo que de forma transitória, alteração na função renal, porém no presente estudo não houve diferença estatística entre os grupos, ocorrendo aumento na concentração de ureia inclusive no grupo que não recebeu ivermectina (EL). Hopper et al (2002) e Nelson et al. (2003) relatam cães intoxicados por ivermectina, enquanto Bruenisholz (2012) relata um pônei também intoxicado por este fármaco, sem alteração na concentração sérica de ureia. Como citado anteriormente, é possível que os animais tenham apresentado hipotensão, a qual pode causar uma redução no fluxo renal. Nestes casos, ocorre aumento da reabsorção passiva da ureia, aumentando sua concentração sérica (Fettman e Rebar, 2007; Braun, 2008).

Foi observado nos grupos IV, IV\_RL e IV\_EL um aumento na concentração sérica de creatinina (Tabela 24), sem diferença estatística entre eles. Apesar de não haver aumento no grupo EL, os valores encontrados nele não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos em que os animais foram intoxicados. Existem relatos que citam este aumento em animais tratados com ivermectina na dose terapêutica (Seri et al., 2001; El-Far, 2013), que receberam tratamento prolongado (Arise e Malomo, 2009; Elzoghby et al, 2015) ou dose considerada tóxica (Saqib et al, 2015), porém esta alteração tem uma tendência a se normalizar após alguns dias. Seri et al. (2001a) sugerem que apesar do aumento na concentração sérica de creatinina, a função renal não foi afetada, uma vez que os valores encontrados permaneceram dentro dos de referência para a espécie envolvida. Por outro lado, o aumento na concentração de creatinina não foi observado por Hopper et al (2002), Nelson et al. (2003) e Bruenisholz (2012) em cães e em um pônei intoxicado por ivermectina. Este aumento, de forma similar ao discutido para a ureia, pode ocorrer após uma hipotensão (causa pré-renal) e consequente redução da taxa de filtração glomerular (Fettman e Rebar, 2007).

Em ambas as avaliações, não houve diferença significativa entre os grupos intoxicados (IV, IV\_RL, IV\_EL) e o não intoxicado (EL), e apesar das variações observadas, em todos os grupos a concentração média de ureia e creatinina se manteve dentro dos valores fisiológicos de referência da espécie (Tabela 22). Sugere-se que a intoxicação pela ivermectina e os tratamentos instituídos não apresentaram influência sobre a função renal do animal, porém a avaliação da ocorrência ou não de alterações histopatológicas (citadas posteriormente neste texto) pode auxiliar na determinação se houve lesão renal significativa.

Tabela 23- Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de ureia (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas)	Grupos			
	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	33,43±10,79 Ba	34,26±12,65 Ba	36,98±10,53 Ba	36,74±7,52 Ba
3	40,21±8,72 Aa	41,56±12,32 Aa	42,64±11,96 ABa	43,02±8,18 ABa
4	43,45±11,12 Aa	42,43±14,93 Aa	51,26±14,38 Aa	48,97±9,40 ABa
6	53,25±8,32 Aa	45,06±14,69 Aa	49,87±14,63 Aa	58,21±15,64 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Tabela 24- Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de creatinina (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas)	Grupos			
	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	1,23±0,20 Ba	1,39±0,19 Ba	1,19±0,20 Ba	1,42±0,33 Ba
3	1,48±0,17 Aa	1,62±0,29 Aa	1,56±0,23 ABa	1,40±0,34 ABa
4	1,49±0,09 Aa	1,54±0,35 Aa	1,17±0,25 Aa	1,28±0,35 ABa
6	1,46±0,14 Aa	1,57±0,37 Aa	1,30±0,15 Aa	1,18±0,23 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

### 5.3.2 ALT, AST, GGT e FA

Durante a análise da atividade da enzima ALT entre os diferentes grupos, somente foi observado aumento dentro do grupo EL (Tabela 25) após a realização da infusão (iniciada no tempo três horas). De forma similar, não houve variação no grupo IV na avaliação da atividade de AST, porém houve aumento em ambos os grupos que receberam infusões lipídicas (IV\_EL e EL) (Tabela 26).

A ausência de alterações da atividade de ALT e AST no grupo IV demonstra que a ivermectina não gerou lesão hepática nos animais intoxicados durante o período de seis horas após a exposição. Por outro lado, o aumento da atividade destas enzimas no grupo EL, e de AST também no grupo EL, sugere que esta alteração foi devido à infusão de emulsão lipídica. Uma quantidade maior de lipídios nos hepatócitos, fornecidos pela emulsão lipídica, pode causar o aumento da atividade sérica das enzimas de extravasamento ALT e AST (Lassen, 2007b).

É importante ressaltar que mesmo com os aumentos nas atividades da ALT e AST, os valores encontrados foram mantidos dentro da normalidade (Tabela 22). Desta forma, sugere-se que a ELI não causou danos significativos à função hepática na dose e tempo utilizados.

Tabela 25- Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima ALT (UI/L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	28,27±10,70 Aa	20,17±8,26 Aa	20,54±6,53 Aa	18,55±4,62 Ba
3	26,66±10,57 Aa	20,59±4,57 Aa	36,39± 39,36 Aa	17,16±5,75 Ba
4	30,14±10,76 Aab	17,94±1,25 Ab	78,17±78,09 Aa	28,26±3,24 ABab
6	34,48±10,20 Aa	18,20±1,73 Aa	42,28±29,34 Aa	39,67±16,55 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Tabela 26- Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima AST (UI/L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	31,59±5,47 Aa	27,18±8,94 Aab	20,96±9,02 Bb	25,89±2,73 Bab
3	37,96±16,87 Aa	39,20±11,73 Aa	32,45±12,69 ABa	27,37±5,09 Ba
4	47,87±29,53 Aa	35,75±14,38 Aa	64,37±50,40 ABa	56,23±32,63 Aa
6	36,27±16,65 Aa	37,12±14,90 Aa	60,62±24,93 Aa	70,82±24,27 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Não foi observada diferença significativa nos valores da atividade da GGT entre os diferentes grupos e entre os diferentes tempos (Tabela 27). Não foi possível realizar comparações com os momentos quatro e seis do grupo IV\_EL, possivelmente devido à interferência da lipemia na realização do teste cinético de mensuração da mesma. É sugerido que tanto a intoxicação por ivermectina quanto os tratamentos instituídos não alteram a atividade desta enzima, ou seja, não existe comprometimento de canalículos biliares e colestase (Campbell, 2007b; Lassen, 2007b). Todas as médias encontradas em todos os grupos e diferentes momentos de avaliação se encontram dentro do valor considerado normal para a espécie (Tabela 21).

Tabela 27- Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima GGT (UI/L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	7,42±1,44 Aa	8,19±3,03 Aa	8,12±1,2 Aa	7,99±2,75 Aa
3	7,29±0,92 Aa	7,31±2,37 Aa	7,01±2,35 Aa	9,28±1,85 Aa
4	7,16±2,21 Aa	6,82±5,90 Aa	**	13,47±3,15 Aa
6	7,33±1,57 Aa	6,99±4,10 Aa	**	8,97±3,52 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

\*\*não houve numero mínimo para comparação; erro na leitura provavelmente devido à lipemia das amostras.

Não foi observada diferença significativa na atividade da enzima FA entre os grupos em um mesmo momento. Ao avaliarmos dentro de cada grupo, observamos que não houve alterações significativas nos grupos IV, IV\_RL e EL. No grupo IV\_EL houve aumento significativo ao compararmos o momento zero com os tempos quatro e seis horas. Este aumento, associado à ausência de alterações nos grupos IV e EL e entre os grupos, provavelmente não é clinicamente significativo por não ser muito superior ao encontrado no tempo zero, considerado como a normalidade deste grupo de animais. Desta forma, sugere-se que a intoxicação por ivermectina e os tratamentos realizados não alteram a atividade da FA. Os valores obtidos foram, porém, mais altos do que os relatados pela literatura como normais para a espécie (Tabela 22 e Tabela 28), inclusive no tempo zero, em que nenhum fármaco havia sido administrado. Sugere-se que estes animais apresentavam, na sua normalidade, valores mais altos de atividade da FA do que o relatado pela literatura.

Tabela 28- Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima FA (UI/L) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas)	Grupos			
	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	116,78±35,07 Aa	150,42±26,80 Aa	162,37±24,63 Ba	143,10±44,28 Aa
3	124,10±29,32 Aa	154,35±16,67 Aa	177,17±18,39 ABa	152,10±45,74 Aa
4	128,29±33,07 Aa	154,75±22,19 Aa	187,65±25,52 Aa	157,23±50,80 Aa
6	130,19±33,25 Aa	161,63±18,81 Aa	183,13±23,36 Aa	155,63±68,66 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

As enzimas ALT, AST, GGT e FA podem ser utilizadas para a avaliação da presença de lesão hepática nos animais. Em coelhos, o aumento na atividade da ALT plasmática é indicador específico de lesão hepática, com correlação positiva entre o aumento desta e o grau de necrose hepática. Por outro lado, o aumento na atividade da AST pode ser consequência de causas extra-hepáticas. A FA de coelhos apresenta três isoenzimas, sendo uma intestinal e duas hepática/renal. Desta forma, esta também pode aumentar devido a causas extra-hepáticas. Para a detecção de alteração hepática em coelhos, a dosagem plasmática da lactato desidrogenase (LDH) pode ser benéfica, porém muitas vezes não é utilizada por apresentar ampla distribuição tecidual e influência de hemólise e do manuseio na sua atividade. A GGT tem origem principal em células epiteliais dos ductos biliares, e a obstrução hepatobiliar causa aumento significativo na atividade desta enzima (Campbell, 2007b; Lassen, 2007b).

Aries e Malomo (2009), Utu-Baku (2009) e Elzoghby (2015) relatam aumento da atividade das enzimas ALT, AST, GGT e FA após a administração de ivermectina em ratos, porém esta foi administrada de forma crônica, diferente do realizado no presente estudo. El-Far (2013) cita aumento na atividade da AST e ALT após a administração de 0,2mg/kg 0,4mg/kg deste fármaco em coelhos, enquanto Sadiq et al. (2015) relatam aumento na atividade das enzimas GGT e FA, sem alteração na das enzimas ALT e AST em um leão intoxicado pela ivermectina. Por outro lado, assim como observado com os marcadores de função renal, Hopper et al. (2002), Nelson et al. (2003) e Bruenisholz (2012) não observaram variações na atividade destas enzimas nos animais intoxicados.

De acordo com os dados encontrados pela avaliação das enzimas ALT, AST, GGT e FA nos diferentes grupos e tempos, é possível concluir que a intoxicação pela ivermectina e os diferentes tratamentos administrados não geraram, no atual experimento, lesão hepática significativa durante o intervalo avaliado.

### 5.3.3 Glicose

O aumento dos valores da concentração sérica de glicose encontrados no grupo IV e observados de forma similar nos grupos IV\_RL e IV\_EL sugere que a administração da ivermectina causou hiperglicemia progressiva nos animais intoxicados (Tabela 22 e Tabela 29). A hiperglicemia

pode ser causada por aumento da concentração de catecolaminas e aumento da concentração de corticoides no animal. As catecolaminas podem ser liberadas na presença de dor e excitação, enquanto os glicocorticoides podem ser liberados secundariamente ao estresse (Lassen, 2007c). Uma vez que os animais do grupo EL não apresentaram hiperglicemia em nenhum momento, sendo submetidos à mesma manipulação dos animais dos outros grupos, acredita-se que a hiperglicemia não foi causada pela excitação. Existe, porém, a possibilidade dos animais intoxicados terem apresentado dor que não foi observada clinicamente, possivelmente por estarem muito deprimidos. El-Far (2013) e Sadek e Shaheen (2015) relatam aumento do cortisol sérico após a administração de ivermectina em doses terapêuticas em ratos e vacas, respectivamente. Este aumento hormonal pode indicar que a ivermectina causa um estresse ao animal, o que justificaria a hiperglicemia. Ratos que receberam ivermectina na dose de 0,4mg/kg, por via oral, durante 15 dias, também apresentaram aumento na concentração sérica de glicose. Os autores sugeriram que este aumento poderia ter ocorrido pelo aumento da mobilização de glicose para o metabolismo, por uma redução no consumo celular da glicose, ou devido a uma modulação da capacidade do túbulo renal em reabsorver glicose ativamente, porém a causa não foi estabelecida (Arise e Malomo, 2009). Por outro lado, Seri et al. (2001), Hopper et al. (2002), Nelson et al. (2003) e Bruenisholz (2012) não observaram alterações na concentração sérica de glicose após exposição à ivermectina, e Saqib et al. (2015) relatam hipoglicemia em um leão intoxicado. Maiores estudos são necessários para estabelecer os mecanismos pelo qual a ivermectina pode ter causado hiperglicemia nos animais intoxicados.

Akbari e Dalir-Naghaded (2014) relatam aumento transitório da glicemia após infusão de emulsão lipídica 10% intravenosa na taxa de 0,025ml/kg/hora durante seis horas em ovelhas. Este aumento não foi observado, porém no grupo EL, o que demonstra que a ELI não atuou sobre a glicemia dos animais no presente estudo. A ausência de diferença significativa entre os grupos IV, IV\_RL e IV\_EL sugere que os tratamentos instituídos não tiveram influência sobre a tendência de elevação da glicemia nos animais intoxicados.

Tabela 29- Valores médios da concentração sérica de glicose (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	98,93±21,49 Ba	116,01±34,48 Ba	118,58±19,65 Ba	103,43±15,38Aa
3	178,10±40,78 Aa	154,91±51,70 ABab	182,73±67,66 ABa	110,63±9,95 Ab
4	203,82±73,13 Aa	154,47±42,36 ABab	176,34±34,53 Aab	119,50±15,79 Ab
6	234,90±62,62 Aa	161,35±43,76 Aab	208,57±43,01 Aa	108,78±15,81 Ab

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

### 5.3.4 Triglicérides e Colesterol

No grupo IV, é possível observar um aumento progressivo significativo na concentração sérica de triglicérides (Tabela 30), o que sugere que a administração da ivermectina resultou em aumento dos valores séricos deste analito. Esta tendência também pode ser observada no grupo IV\_RL.

A síntese de triglicérides ocorre principalmente no fígado, tecido adiposo, intestino delgado e glândula mamária, sendo que este último secreta estes lipídios no leite. A sua concentração sérica é equilibrada pela absorção intestinal, síntese e secreção hepática, e secreção no tecido adiposo, porém esta regulação ainda não é completamente conhecida. Sabe-se que ela sofre a influência de hormônios como o glucagon, catecolaminas e insulina (Lassen e Veltman, 2007; Bruss, 2008). Ao conhecimento do autor, não existem relatos que associam a intoxicação por ivermectina à ocorrência de hipertrigliceridemia. Não foi encontrada uma justificativa clara para este aumento observado e, desta forma, maiores estudos são necessários para determinar a causa pela qual os animais intoxicados por ivermectina apresentaram hipertrigliceridemia.

Nos tempos quatro e seis horas há uma diferença entre os grupos que não receberam emulsão lipídica (IV e IV\_RL) e os que a receberam (IV\_EL e EL), com valores mais altos nos últimos. Uma vez que as emulsões lipídicas são fontes de ácidos graxos (Chan, 2005; Driscoll, 2006; Bonfim et al., 2012), é esperado que esta concentração aumente imediatamente após a sua infusão. Este fato foi evidenciado por Akbari e Dalir-Naghadeh (2014) que descreveram aumento de sete vezes na concentração de triglicérides de ovelhas após a realização de infusão intravenosa de emulsão lipídica 10% na taxa de 0,025ml/kg/min durante seis horas, com retorno aos valores normais após 24 horas.

É importante ressaltar que em ambos os grupos que receberam a ELI, os animais apresentaram hipertrigliceridemia intensa (Tabela 22 e Tabela 30). Um dos cuidados recomendados durante a administração das ELI é a tentativa da manutenção da concentração sérica dos triglicérides dentro dos valores de normalidade (Chan, 2005). Deste modo, é possível que outro protocolo fosse mais adequado para gerar menor alteração na concentração sérica de triglicérides. Este fato corrobora a hipótese de que o protocolo mais adequado irá variar não somente com o agente tóxico envolvido, mas também com a espécie acometida. Por outro lado, é possível que um intervalo maior de monitoração pós-administração da ELI demonstrasse uma redução gradual desta concentração.

Tabela 30- Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de triglicérides (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	69,58±13,30 Ca	105,38±55,66 Ba	99,08±27,23 Ca	73,31±14,34 Ca
3	110,98±30,51 Bab	140,19±68,36 ABa	196,20±122,55 Ba	66,83±9,72 Cb
4	130,97±45,53 ABb	183,30± 104,67Ab	2365,72±372,91 Aa	1736,28±292,39 Aa
6	186,67±101,64 Ab	212,34±131,67 Ab	2230,32±602,40 Aa	1233,10±144,68 Ba

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Em todos os grupos foi observada no tempo zero, antes da administração de qualquer fármaco, concentração sérica de colesterol maior do que os valores de referência estabelecidos para a espécie (Tabela 22 e Tabela 31). A concentração normal de colesterol nesta espécie pode variar de acordo com a idade, raça, linhagem e sexo do animal (Campbell, 2007b). Desta forma, sugere-se que este grupo de animais apresenta em sua normalidade concentração sérica de colesterol mais elevada do que o referido pela literatura.

Não foi observada diferença significativa dentro do grupo IV, o que sugere que a ivermectina não altera a concentração sérica de colesterol dos animais intoxicados. Nos tempos quatro e seis horas, é possível observar diferença significativa entre os grupos que não receberam a ELI (IV e IV\_RL) e os que a receberam (IV\_EL e EL). Desta forma, é possível concluir que a administração da ELI foi responsável pelo aumento na concentração de colesterol dos animais. De forma similar ao que foi observado com os triglicérides, nos grupos que receberam a ELI há aumento na concentração sérica de colesterol após a infusão da mesma. Esta variação é justificada pelo fato da ELI ser fonte de ácidos graxos (Chan, 2005; Driscoll, 2006; Bonfim *et al.*, 2012). Em ambos os grupos, após esta infusão, os animais apresentaram hipercolesterolemia. Desta forma, a infusão de ELI na dose utilizada causou hipercolesterolemia em coelhos.

Tabela 31- Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de colesterol (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	90,97±37,20 Aa	104,43±48,94 Aa	108,97±41,41 Ba	103,90±64,05 Ba
3	84,42±32,27 Aa	93,41±40,84 Ba	104,86±37,36 Ba	100,80±61,23 Ba
4	84,96±31,24 Aa	88,74±37,87 Ba	681,84±677,43 Ab	810,40±1133,83 Ab
6	72,79±21,58 Aa	89,41±37,37 Ba	884,04±666,43 Ab	755,68±839,838 Ab

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

### 5.3.5 Proteína Total e Albumina

Na avaliação da concentração sérica de proteína total (Tabela 32) é possível observar no grupo IV que não houve diferença estatística entre o tempo zero e o seis horas, o que sugere que a ivermectina não alterou este parâmetro. Esse achado é compatível com o relatado por Seri et al. (2001a). Por outro lado, no grupo IV\_RL é observada redução significativa da concentração total de proteína a partir do momento em que a infusão de ringer lactato é realizada. Por isso, esta alteração pode ser justificada pelo efeito diluidor da fluidoterapia (Fettman, 2007; Stockham e Scott, 2008b; Tvedten, 2010). Esta redução não apresenta importância clínica, uma vez que o valor encontrado ainda se encontra dentro dos limites de referência para a espécie.

Foi observado, também, que nos tempos zero e três horas não há variação significativa na concentração de proteína total entre os quatro grupos. Porém, nos tempos quatro e seis horas há diferença entre os grupos que receberam a emulsão lipídica (IV\_EL e EL) e os que não a receberam. Dentro dos grupos IV\_EL e EL a concentração proteica total encontrada nos tempos quatro e seis é maior em relação aos momentos zero e três horas. Estes achados sugerem que a lipemia prejudicou esta quantificação, uma vez que a lipemia causa turvação do soro e o método utilizado é espectrofotometria por métodos colorimétricos (Lassen, 2007a).

Tabela 32- Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de proteína total (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	5,56±0,71 Aa	5,58±0,42 Aa	5,57±0,52 Ba	6,14±0,54 Ba
3	5,14±0,49 ABa	5,12±0,50 ABa	5,39±0,45 Ba	5,67±0,39 Ba
4	5,11±0,55 Bb	4,97±0,40 Bb	13,78±6,41 Aa	9,00±1,37 Aa
6	5,34±0,42 ABb	5,03±0,52 Bb	10,54±0,54 Aa	8,91±1,79 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

Nos grupos IV e IV\_RL pode-se observar redução da concentração de albumina. No grupo IV\_RL, a redução na concentração sérica de albumina pode ser justificada pela hemodiluição causada pela infusão de ringer lactato (Fettman, 2007; Stockham e Scott, 2008b; Tvedten, 2010). Assim como foi descrito anteriormente, a transferência de fluido intersticial ao sangue em resposta a uma possível hipotensão pode ter efeito diluidor (Thrall, 2007; Stockham e Scott, 2008a), justificando a redução na concentração de albumina do tempo zero para o tempo seis horas no grupo IV. Esta redução após a exposição à ivermectina também foi relatada por Seri et al. (2001a), Arise e Malomo, (2009) e Elzoghby et al. (2015).

Ao comparar a concentração sérica de albumina em todos os grupos nos tempos zero e três horas não há diferença significativa entre eles (Tabela 33). Nos momentos quatro e seis horas, há diferença entre o grupo IV\_EL e os grupos IV e IV\_RL. E. A lipemia observada nestes grupos nos tempos quatro e seis horas pode ter interferido, novamente, na leitura da concentração da albumina, superestimando a mesma, uma vez que os métodos utilizados na espectrofotometria, para esses analitos, são colorimétricos (Lassen, 2007a). Isto também pode ser observado pela maior concentração de albumina nos tempos quatro e seis em relação aos tempos anteriores nos grupos IV\_EL e EL.

Tabela 33- Valores médios e desvio padrão da concentração sérica de albumina (mg/dL) nos diferentes grupos e tempos avaliados.

Tempo (horas) \ Grupos	IV	IV_RL	IV_EL	EL
0	4,25±0,49 Aa	4,22±0,30 Aa	4,27±0,23 Ba	4,46±0,31 Ba
3	3,94±0,39 Ba	3,92±0,29 ABa	4,08±0,20 Ba	4,17±0,22 Ba
4	3,88±0,41 Bb	3,80±0,31 Bb	7,36±3,81 Aa	5,21±0,55 Aab
6	3,98±0,39 Bb	3,87±0,27 Bb	7,03±3,53 Aa	5,23±0,32 Aab

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.



## 5.4 Quantificação da Ivermectina em Fígado, Gordura, Encéfalo e Rim

Em todos os grupos, foi encontrada maior concentração de ivermectina em fígado e gordura. O encéfalo, dentre os órgãos analisados, apresentou a menor concentração de ivermectina. No rim a presença do fármaco foi menor do que a encontrada em fígado e gordura, porém maior do que a em encéfalo (Tabela 34 e Figura 7). Estes resultados são compatíveis com os relatos de Chiu et al. (1990a), Chiu et al. (1990b) e Canga et al. (2009).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na concentração de ivermectina encontrada no fígado, gordura e no encéfalo. Desta forma, sugere-se que os tratamentos não alteraram, nas três horas após a sua realização, a quantidade de ivermectina depositada nestes órgãos. Existe a possibilidade do tempo entre a infusão da ELI e o momento da eutanásia ter sido curto para que houvesse efetiva redução nestas concentrações segundo o efeito de sequestro proposto pela teoria de *lipid sink* (Weinberg et al., 1998; Weinberg et al., 2003; Weinberg et al., 2006; Cave e Harvey, 2009; Fernandez et al., 2011).

Tabela 34- Médias e desvio padrão da quantificação de ivermectina (mg/kg de tecido) em fígado, gordura, rim e encéfalo nos diferentes grupos.

Grupo \ Órgão	Fígado	Gordura	Rim	Encéfalo
IV	6,73±3,76 Ab	6,06±2,49 Abc	2,76±1,18 Ac	0,36±0,26 Aa
IV_RL	5,25±2,17 Ab	6,00±3,22 Abc	2,37±1,05 Ac	0,41±0,51 Aa
IV_EL	5,88±2,50 Ab	5,71±0,96 Ab	4,31±2,35 Ab	0,48±0,18 Aa

\* Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas iguais ou letras minúsculas iguais na linha referem a valores estatisticamente iguais.

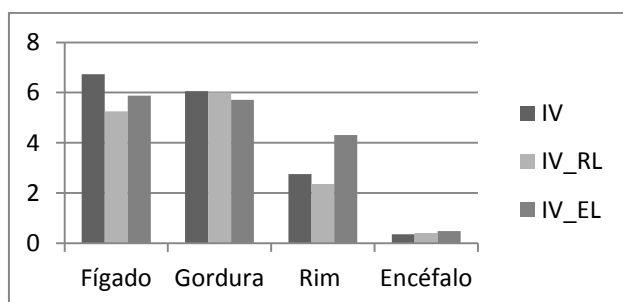


Figura 10 - Gráfico das médias da quantificação de ivermectina (mg/kg de tecido) em fígado, gordura, rim e encéfalo nos diferentes grupos.

## 5.5 Óbitos

Dos 24 animais utilizados neste experimento, cinco foram a óbito antes de serem eutanasiados. A Tabela 35 demonstra em quais grupos e momentos os óbitos ocorreram.

Tabela 35- Distribuição dos óbitos nos diferentes grupos e tempos.

Grupo \ Tempo	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas
IV	-	1 animal	1 animal	-
IV_RL	-	1 animal	-	1 animal
IV_EL	-	1 animal	-	-
EL	-	-	-	-

É possível observar que dos cinco animais que morreram, três foram em momento prévio ao tratamento (tempo três horas). Nenhum animal do grupo EL foi a óbito. É possível que melhor resposta clínica, e menor número de óbitos, ocorressem caso os tratamentos fossem instituídos de forma mais precoce, porém muitas vezes na prática hospitalar o animal é atendido transcorrido período maior que três horas da exposição ao fármaco.

### **5.6 Avaliação Macroscópica e Histológica**

À macroscopia de todos os órgãos, não foram observadas alterações. No encéfalo não foram observadas alterações histológicas, corroborando com Dadarkar et al. (2007) em ratos intoxicados pela ivermectina.

Em todos os grupos, sem variação significativa entre eles, congestão foi observada nos fragmentos de rim (Figura 11), coração, baço e fígado. Uma vez que não houve variação entre os grupos, estes achados não foram causados pela intoxicação ou pelos tratamentos realizados. A eutanásia realizada por sobredose de barbitúricos, como o tiopental utilizado no presente experimento, pode causar congestão passiva (Fry e McGavin, 2012).

No fígado foi observada, sem diferença significativa entre os grupos, presença de hematopoese extramedular e discreta a moderada quantidade de vacúolos bem delimitados intracitoplasmáticos nos hepatócitos (Figura 12).

A hematopoese pós-natal pode ocorrer em condições de aumento na demanda de células sanguíneas. Porém o grau desta produção em pequenos animais pode ser um achado incidental (Stalker e Hayes, 2007). Ao relacionar esta alteração com a hematologia discutida previamente é possível concluir que esta não apresenta significado clínico.

A vacuolização citoplasmática nos hepatócitos pode ocorrer por degeneração hidrópica, glicogênica (associada ao hiperadrenocorticismos), e lipidose. A degeneração hidrópica pode ser observada após insultos tóxicos ou metabólicos variados, hipóxia ou colestase (Stalker e Hayes, 2007). É importante ressaltar que segundo Campbell (2007b) a ocorrência de colestase em coelhos resultaria em aumento na atividade da GGT, fato não evidenciado neste estudo, como relatado anteriormente. Uma vez que no presente estudo esta alteração foi observada de forma similar em todos os grupos, sem diferença estatisticamente significativa entre eles, conclui-se que ela não foi causada pela intoxicação por ivermectina ou como consequência dos tratamentos instituídos. Por outro lado, todos os animais foram submetidos a jejum alimentar prolongado de 12 horas. Desta forma, acredita-se que houve aumento na mobilização de triglicérides da gordura como tentativa de manter o metabolismo energético nestes animais durante o período de jejum, sendo estes depositados nos hepatócitos causando a vacuolização observada. A aparência microscópica dos glóbulos de triglicérides nos hepatócitos varia de micro a macrovacúolos bem delimitados. O aumento na mobilização tende a produzir lipidose microvacuolar, como foi observado nestes animais (Stalker e Hayes, 2007). Dadarkar et al. (2007) relatam necrose centro-lobular discreta e hemorragia em ratos intoxicados de forma aguda pela ivermectina. Estes achados não foram encontrados no presente experimento.

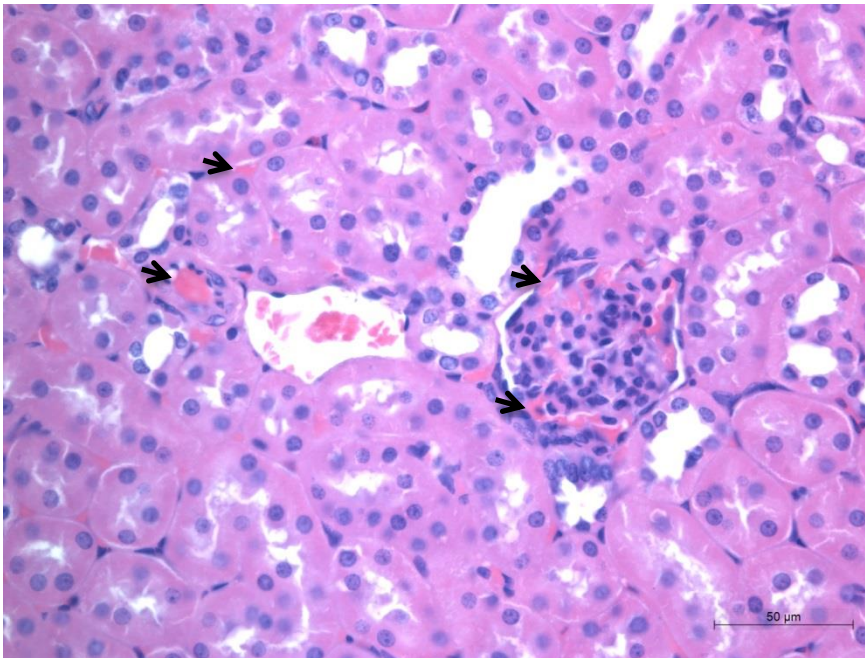


Figura 11: Rim, cortical: hiperemia passiva (congestão) multifocal discreta (setas). HE: 400x.

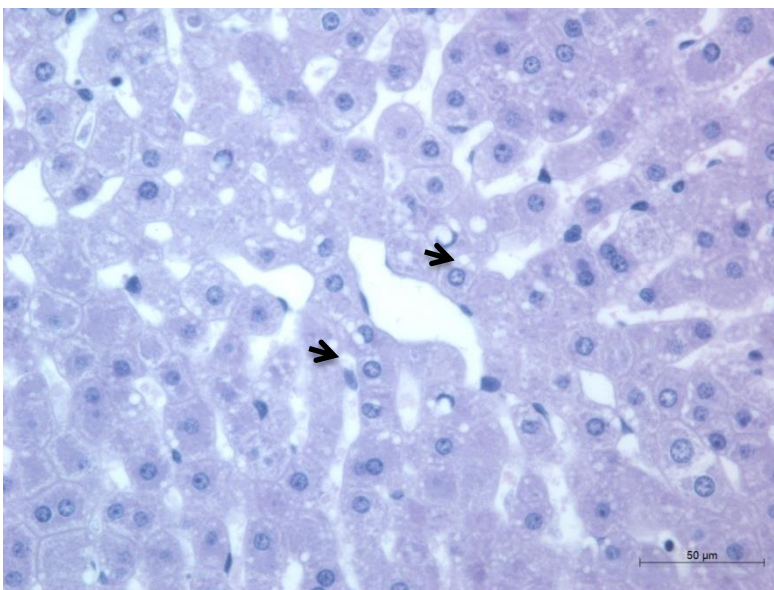


Figura 12: Fígado: degeneração micro- e macro vacuolar multifocal discreta (setas). HE: 400x.

Desta forma, em consonância com os resultados bioquímicos discutidos anteriormente, a intoxicação pela ivermectina e os tratamentos instituídos não causaram lesão hepática ou renal. Também não houve dano histológico ao encéfalo e ao baço.

## **6. CONCLUSÕES**

Coelhos Nova Zelândia podem ser utilizados como modelo experimental de intoxicação por ivermectina por via oral. Este fármaco causou nestes animais alterações clínicas, principalmente neurológicas, porém sem danos significativos à função renal e hepática, apesar do alto acúmulo de ivermectina nestes órgãos, e sem danos histopatológicos a estes e ao encéfalo e baço. A infusão de emulsão lipídica não se mostrou, nas três horas posteriores à sua realização, efetiva em alterar as manifestações clínicas e a deposição orgânica da ivermectina nos animais intoxicados. Porém, esta terapia se mostrou clinicamente e histologicamente segura.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Maiores estudos são necessários para avaliar a efetividade da emulsão lipídica intravenosa, e o protocolo mais adequado, em casos de intoxicação pela ivermectina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARI, H., DALIR-NAGHADEH, B. The effects of short term intravenous infusion of a soybean based lipid emulsion on some blood constituents in sheep: A preliminary study. *Veterinary Research Forum*, v.5, n.1, p.35-41, 2014.
- AL-AZZAM, S.I., FLECKENSTEIN, L., CHENG, K.J., DZIMIANSKI, M.T., MCCALL, J.W. Comparison of the Pharmacokinetics of Moxidectin and Ivermectin after Oral Administration to Beagle Dogs. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v.28, n.8, p.431-438, 2007.
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAINBAHER, D., SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, v.86, n.2, p.412-431, 2003.
- ARISE, R.O., MALOMO, S.O. Effects of ivermectina and albendazole on some liver and kidney function indices in rats. *African Journal of Biochemistry Research*, v.3, n.5, p.190-197, 2009.
- BARBOSA, O.R., SCAPINELO, C., MARTINS, E.N., MENDES, L.D.V., SUGOHARAS, A., SAITO, E.Y. Desempenho de Coelhos da Raça Nova Zelândia Branco, Criados em Diferentes Tipos de Instalações Durante as Estações de Verão e Inverno. 1.Temperatura Corporal, Frequência Respiratória, Consumo de Ração, Ganho de Peso e Conversão Alimentar. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.21, n.5, p.779-786, 1992.
- BASSISSI, F., LESPINE, A., ALVINERIE, M. Assessment of a liposomal formulation of ivermectin in rabbit after a single subcutaneous administration. *Parasitology Research*, v.98, n.3, p.244-249, 2006.
- BATES, N., CHATTERTON, J., ROBBINS, C., WELLS, K., HUGHES, J., STONE, M., CAMPBELL, A. Lipid infusion in the management of poisoning: a report of 6 canine cases. *Veterinary Record*, v.172, n.13: 339, 2013.
- BONFIM, M.R., MELO, M.D.S., DREYER, E., BORSOI, L.F.A., OLIVEIRA, T.G., UDELSMANN, A. Terapia Lipídica com Dois Agentes na Intoxicação por Ropivacaína. Estudo Experimental em Suínos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.62, n.5, p.690-695, 2012.
- BRAUN, J.P. Kidney Function and Damage. In: KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Sixth Edition. Massachusetts: Academic Press, 2008. p. 492-493.
- BRUENISHOLZ, H., KUPPER, J., MUENTENER, C.R., DALLY, A., KRAEMER, T., NAEGELI, H., SCHWARZWALD, C.C. Treatment of Ivermectin Overdose in a Miniature Shetland Pony Using Intravenous Administration of a Lipid Emulsion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.26, n.2, p.407-411, 2012.
- BRUSS, M.L. Lipids and Ketones. In: KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Sixth Edition. London: Elsevier, 2008. p.86-87.
- BUTLER, J. Successful treatment of baclofen overdose with intravenous lipid emulsion. *Veterinary Medicine*, p.6-12. 2014. Disponível em <http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Toxicology/Successful-treatment-of-baclofen-overdose-with-int/ArticleStandard/Article/detail/832273>. Acesso em 25 de Abril de 2014
- CALONI, F., CORTINOVIS, C., PIZZO, F., RIVOLTA, M., DAVANZO, F. Epidemiological study (2006-2012) on the poisoning of small animals by human and veterinary drugs. *Veterinary Record*, v.174, n.9: 222, 2014.

CAMPBELL, T. W. Hematologia de Mamíferos: Animais de Laboratório e Espécies Variadas. In: THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.201-206, 208-210.a

CAMPBELL, T. W. Bioquímica Clínica de Mamíferos: Animais de Laboratório e Espécies Variadas. In: THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2007. p. 433-434, 439-440.b

CAMPBELL, W.C. History of Avermectin and Ivermectin, with Notes on the History of Other Macrocyclic Lactone Antiparasitic Agents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v.13, n.6, p.853-865, 2012.

CAMPBELL, W.C., FISHER, M.H., STAPLEY, E., ALBERS-SCHONBERG, G., JACOB, T.A. Ivermectin: A Potent New Antiparasitic Agent. *Science*, v.221, n.4613, p.823-828, 1983.

CANGA, A.G., PRIETO, A.M.S., LIÉBANA, M.J.D., MARTÍNEZ, N.F., VEGA, M.S., VIEITEZ, J.J.G. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal*, v.179, n.1, p.25-37, 2009.

CAVE, G., HARVEY, M. Intravenous Lipid Emulsion as Antidote Beyond Local Anesthetic Toxicity: A Systematic Review. *Academic Emergency Medicine*, v.16, n.9, p.815-824, 2009.

CHABALA, J.C., MROZIK, H., TOLMAN, R.L., ESKOLA, P., LUSI, A., PETERSON, L.H. WOODS, M.F., FISHER, M.H., CAMPBELL, W.C., EGERTON, J.R., OSTLIND, D.A. Ivermectin, a New Broad-Spectrum Antiparasitic Agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.23, n.10, p.1134-1136, 1980.

CHAN, D. Parenteral Nutritional Support. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Sixth Edition. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. Volume 1, Chapter 159, 2005, p.588.

CHIU, S.H.L., GREEN, M.L., BAYLIS, F.P., ELINE, D., ROSEGAY, A., MERIWETHER, H., JACOB, T.A. Absorption, Tissue Distribution, and Excretion of Tritium-Labeled Ivermectin in Cattle, Sheep, and Rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.38, n.11, p.2072-2078, 1990a.

CHIU, S.H.L., SESTOKAS, E., TAUB, R., GREEN, M.L., BAYLIS, F.P., JACOB, T.A., LU, A.Y.H. Metabolic Disposition of Ivermectin in Swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.38, n.11, p.2079-2085, 1990b.

CHUNG, K., YANG, C.C., WU, M.L., DENG, J.F., TSAI, W.J. Agricultural Avermectins: An Uncommon But Potentially Fatal Cause of Pesticide Poisoning. *Annals of Emergency Medicine*, v.34, n.1, p.51-57, 1999.

COELHO, C.N., NUNES, T.A.P., BATISTA, L.C.S.O., SILVA, D.D., SANTOS, R.R., CORREIA, T.R., SCOTT, F.B., FERNANDES, J.I. Eficácia da ivermectina oral no controle de *Psoroptes ovis* e *Leporacarus gibbus* em coelhos naturalmente infestados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, n.9, p.832-836, 2014.

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.

DADARKAR, S.S., DEORE, M.D., GATNE, M.M. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.47, n.3, p.257-260, 2007.

- DE SOLE, G., REMME, J., AWADZI, K., ACCORSI, S., ALLEY, E.S., BA, O., DADZIE, K.Y., GIESE, J., KARAM, M., KEITA, F.M. Adverse reactions after large-scale treatment of onchocerciasis with ivermectin: combined results from eight community trials. *Bulletin of the World Health Organization*, v.67, n.6, p.707-719, 1989.
- DONNELLY, T.M. Basic Anatomy, Physiology and Husbandry. In.: HILLYER, E.V., QUESENBERRY, K.E. *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. First Edition. Pennsylvania: W.B.Saunders Company, 1997. p.148.
- DORMAN, D.C. Síndromes Neurotóxicas. In: DEWEY, C.W. *Neurologia de Cães e Gatos: Guia Prático*. 1ª edição. São Paulo: Roca, 2006. p. 325, 335-336.
- DRISCOLL, D.F. Lipid Injectable Emulsions: Pharmacopeial and Safety Issues. *Pharmaceutical Research*, v.23, n.9, p.1959-1969, 2006.
- EL-FAR, A.H. Effect of Therapeutic and Double Therapeutic Doses of Ivermectin on Oxidative Status and Reproductive Hormones in Male Rabbits. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, v.8, n.3, p.128-133, 2013.
- ELZOGHBY, R.R., AMIN, A., HAMOUDA, A.F., ALI, A.F. Toxicological and pathological studies of Ivermectin on male albino rats. *Journal of American Science*, v.11, n.3, p.73-83, 2015.
- ENSLEY, S. Pyrethrins and pyrethroids. In.: Gupta, R.C. *Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles*. New York: Elsevier, 2007. Chapter 41, 2007, p.494-498.
- EPSTEIN, S.E., HOLLINGSWORTH, S.R. Ivermectin-induced blindness treated with intravenous lipid therapy in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.23, n.1, p.58-62, 2013.
- FERNANDEZ, A.L., LEE, J.A., RAHILLY, L., HOVDA, L., BRUTLAG, A.G., ENGBRETSEN, K. 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.
- FERNANDEZ, V.L., BERNARDINI, M. Neuroanatomia. In: FERNANDEZ, V.L., BERNARDINI, M. *Neurologia em Cães e Gatos*. 1ª Edição. São Paulo: Editora Medvet, 2010. p.24-26.
- FETTMAN, M.J. Metabolismo de Fluidos e Eletrólitos. In.: THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1ª. Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.311.
- FETTMAN, M.J., REBAR, A. Avaliação Laboratorial da Função Renal. In.: THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1ª. Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.283-287.
- FRY, M.M., MCGAVIN, M.D. Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphatic System. In.: ZACHARY, J.F., MCGAVIN, M.D. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Fifth Edition. St. Louis: Elsevier, 2012. p. 752.
- GHANE, M., POURJAFAR, M., BADIEI, K. Ivermectin toxicity in three Holstein calves. *Toxicology Letters*, v.205, p.S87, 2011.
- GOKBULUT, C., BILIGILI, A., KART, A., TURGUT, C. Plasma dispositions of ivermectin, doramectin and moxidectin following subcutaneous administration in rabbits. *Laboratory Animals*, v.44, n.2, p.138-142, 2010.
- GUPTA, R.C. Ivermectin and selamectin. In.: Gupta, R.C. *Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles*. New York: Elsevier, 2007. Chapter 45, 2007, p.508-513.



- 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.
- HALL, A.H., SPOERKE, D.G., BRONSTEIN, A.C., KULIG, K.W., RUMACK, B.H. apud MERCK, SHARP, DOHME, Division of Merck and Company, Inc: *Ivermectin Poison Control Monography*. West Point, PA, Merck Sharp & Dohme, 1985, p.1-18.
- 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.
- HERNANDO, M.D., SUÁREZ-BARCENA, J.M., BUENO, M.J.M., GARCIA-REYES, J.F., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food. *Journal of Chromatography A*, v.1155, n.1, p.62-73, 2007.
- HEWITT, C.D., INNES, D.J., SAVORY, J., WILLS, M.R. Normal Biochemical and Hematological Values in New Zealand White Rabbits. *Clinical Chemistry*, v.35, n.8, p.1777-1779, 1989.
- HOPPER, K., ALDRICH, J., HASKINS, S.C. Ivermectin Toxicity in 17 Collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.16, n.1, p.89-94, 2002.
- INOUE, K., YOSHIMI, Y., HINO, T., OKA, H. Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, v.32, n.21, p.3596-3602, 2009.
- JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea and Febiger. 417p, 1993.
- JOHNSON, C. Neurohistology, physiology and supporting structures. In.: THOMSON, C., HAHN, C. *Veterinary Neuroanatomy: A Clinical Approach*. First Edition. Elsevier, 2012. p.21-22.
- JOURDAN, G., BOYER, G., RAYMOND-LETRON, I., BOUHSIRA, E., BEDEL, B., VERWAERDE, P. Intravenous lipid emulsion therapy in 20 cats accidentally overdosed with ivermectin. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.25, n.5, p.667-671, 2015.
- JOVIC-STOSIC, J., GLIGIC, B., PUTIC, V., BRAJKOVIC, G., SPASIC, R. Severe propranolol and ethanol overdose with wide complex tachycardia treated with intravenous lipid emulsion: A case report. *Clinical Toxicology*, v.49, n.5, p.426-430, 2011.
- KIDWELL, J.H., BUCKLEY, G.J., ALLEN, A.E., BANDT, C. Use of IV Lipid Emulsion for Treatment of Ivermectin Toxicosis in a Cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.50, n.1, p.59-6, 2014.
- 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.
- LANKAS, G.R., CARTWRIGHT, M.E., UMBENHAUER, D. P-Glycoprotein Deficiency in a Subpopulation of CF-1 Mice Enhances Avermectin-Induced Neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.143, n.2, p.357-365, 1997.
- LANKAS, G.R., GORDON, L.R. Toxicology. In.: CAMPBELL, W.C. *Ivermectin and Abamectin*. New York: Springer-Verlag, 1989. Chapter 6, 1989, p.89-102.
- LASSEN, E.D. . In: THRALL, M. A. *Considerações sobre Interpretação de Resultados de Exames Laboratoriais*. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.50. a

- LASSEN, E.D. Avaliação Laboratorial do Fígado. In: THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.335-354. b
- LASSEN, E.D. Avaliação Laboratorial do Pâncreas Endócrino e do Metabolismo da Glicose. In: THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.406-408. c
- LASSEN, E.D., FETTMAN, M.J. Avaliação Laboratorial dos Lipídios. In.: THRALL, M.A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª. Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.398-401.
- LITZ, R.J., ROESSEL, T., HELLER, A.R., STEHR, S.N. 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.
- LIPMAN, N.S., MARINI, R.P., FLECKNELL, P.A. Anesthesia and Analgesia in Rabbits. In: KOHN, D.F., WIXSON, S.K., WHITE, W.J., BENSON, G.J. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. Elsevier, 1997. Chapter 10, 1997, p. 211, 212, 223.
- LO, P.K.A., FINK, D.W., WILLIAMS, J.B., BLODINGER, J. Pharmacokinetic Studies of Ivermectin: Effects of Formulation. *Veterinary Research Communications*, v.9, n.4, p.251-268, 1985.
- MAGNAGHI, V., BALLABIO, M., CAMOZZI, F., COLLEONI, M., CONSOLI, A., GASSMAN, M., LAURIA, G., MOTTA, M., PROCACCI, P., TROVATO, A.E., BETTLER, B. Altered peripheral myelination in mice lacking GABA<sub>B</sub> receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v.37, n.3, p.599-609, 2008.
- MELLGREN, M., BERGVALL, K. Treatment of rabbit cheyletiellosis with selamectin or ivermectina: a retrospective case study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.50, n.1, p.1-6, 2008.
- MÉNEZ, C., SUTRA, J.F., PRICHARD, R., LESPINE, A. Relative Neurotoxicity of Ivermectin and Moxidectin in Mdr1ab (-/-) Mice and Effects on Mammalian GABA(A) Channel Activity. *Neglected Tropical Disease*, v.6, n.11, p.1-10, 2012.
- MEROLA, V., KHAN, S., GWALTNEY-BRANT, S. Ivermectin Toxicosis in Dogs: A Retrospective Study. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.45, p.106-111, 2009.
- MOHSEN, G., POURJAFAR, M., BADI EI, K., HABIBI, H. Ivermectin toxicity in a goat herd. *Toxicology Letters*, v.211, p.S213-S214, 2012.
- NELSON, O.L., CARSTEN, E., BENTJEN, S.A., MEALEY, K.L. Ivermectin Toxicity in an Australian Shepherd Dog with the MDR1 Mutation Associated with Ivermectin Sensitivity in Collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.17, n., p.354-356, 2003.
- NIIYA, T., LITONIUS, E., PETÄJÄ, L., NEUVONEN, P.J., ROSENBERG, P.H. 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, 2010.
- OEHME, F.W. Effects of Pesticides on Domestic Animals. In.: HAYES, W.J., LAWS, E.R. *Handbook of Pesticide Toxicology*. London: Academic Press Limited, 1991. Volume 1, Chapter 10, 1991, p.453-461.
- OTI, C., UNCLES, D., SABLE, N., WILLERS, J. The use of Intralipid for unconsciousness after a mixed overdose. *Journal of the Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland*, v.65, n.1, p.110-111, 2010.

- PAES, P.R.O., LEME, F.O.P., CARNEIRO, R.A. Avaliação das Hemácias. In.: PAES, P.R.O., LEME, F.O.P., CARNEIRO, R.A. Hematologia dos Animais Domésticos.1ª. Edição. Minas Gerais: FEPMVZ, 2009. p.11-13.
- PÉREZ, R., CABEZAS, I., GODOY, C., RUBILAR, L., MUNOZ, L., ARBOIX, M., CASTELLS, G., ALVINERIE, M. Pharmacokinetics of Doramectin and Ivermectin After Oral Administration in Horses. *The Veterinary Journal*, v.163, n.2, p.161-167, 2002.
- PICARD, J., WARD, S.C., ZUMPE, R., MEEK, T., BARLOW, J., HARROP-GRIFFITHS, W. Guidelines and the adoption of the ‘lipid rescue’ therapy for local anaesthetic toxicity. *Journal of the Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland*, v.64, n.2, p.122-125, 2009.
- PRESTES, O.D., ADAIME, M.B., ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatografica*, v.3, n.1, p.51-64, 2011.
- PULLIAM, J.D., PRESTON, J.M. Safety of Ivermectin in Target Animals. In.: CAMPBELL, W.C. *Ivermectin and Abamectin*. New York: Springer-Verlag, 1989. Chapter 10, 1989, p.157-159.
- RAY, D.E. Pesticides Derived from Plants and Other Organisms. In.: HAYES, W.J., LAWS, E.R. *Handbook of Pesticide Toxicology*. London, Academic Press Limited, 1991. Volume 2, Chapter 13, 1991, p.585-591, 595-596, 622-623.
- ROULET, A., PUEL, O., GESTA, S., LEPAGE, J.F., DRAG, M., SOLL, M., ALVINERIE, M., PINEAU, T. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectina. *European Journal of Pharmacology*, v.460, n.2-3, p.85-91, 2003.
- RUBIES, A., ANTKOWIAK, S., GRANADOS, M., COMPANYÓ, R., CENTRICH, F. Determination of avermectins: A QuEChERS approach to the analysis of food samples. *Food Chemistry*, v.181, p.57-63, 2015.
- SADEK, K.M., SHAHEEN, H.M. The biochemical effects of ivermectina on reproductive hormones and mineral homeostasis in Baladi cows post parturition. *Veterinarski Arhiv*, v.85, n.1, p.95-103, 2015.
- SALZO, P.S.; Demodicose canina. O que há de novo? *Revista Nosso Clínico*, v. 66, p.26-28, 2008.
- SANFORD, S.E., REHMTULLA, A.J., JOSEPHSON, G.K.A. Ivermectin Overdose and Toxicosis in Neonatal Pigs. *The Canadian Veterinary Journal*, v.29, p.735-736, 1988.
- SAMPAIO, I.B.M. Introdução. In: SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010. Capítulo 1, 2010. p. 1-6.
- SAQIB, M., ABBAS, G., MUGHAL, M.N. Successful management of ivermectina induced blindness in an African lion (*Panthera leo*) by intravenous administration of a lipid emulsion. *BMC Veterinary Research*, v.11, n.287, p.1-7, 2015.
- SCHONROCK, B., BORMANN, J. Activation of Cl<sup>-</sup> by avermectin in rat cultured hippocampal neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v.348, p.628-632, 1993.
- SERI, H.I., BARSHAM, M.A., HASSAN, T., BARAKA, O.Z., ALSALAM, O.A. Some biochemical changes of ivermectin “Ivomec” intravenously administered to camels “*Camelus dromedarius*”. *The Sudan Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, v.40, n.1&2 p.162-168, 2001a.


- SERI, H.I., MAGEED, T.O.A., ALSALAM, O.A. Some haematological changes in Camels “*Camelus dromedarius*” following subcutaneous injection of Ivomec. *The Sudan Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, v.40, n.1&2 p.157-161, 2001b.
- SPINELLI, M.O., MOTTA, M.C., CRUZ, R.J., GODOY, C.M.S.C. Estudo dos Analitos Bioquímicos no Plasma de Coelho (Nova Zelândia) Mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v.1, n.2, p.163-168, 2012.
- STALKER, M.J., HAYES, M.A. Liver and biliary system. In: MAXIE. Jubb, Kennedy and Palmer’s Pathology of Domestic Animals. Fifth edition. Volume 2. Philadelphia: Elsevier, 2007. p.301, 309-312.
- STOCKHAM, S.L., SCOTT, M.A. Erythrocytes. In.: STOCKHAM, S.L., SCOTT, M.A. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Second Edition. Iowa: Blackwell, 2008. p.167-168. a
- STOCKHAM, S.L., SCOTT, M.A. Proteins. In.: STOCKHAM, S.L., SCOTT, M.A. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Second Edition. Iowa: Blackwell, 2008. p.390, 396, 400-401, p.724. b
- SUNG, Y.F., HUANG, C.T., FAN, C.K., LIN, C.H., LIN, S.P. Avermectin intoxication with coma, myoclonus, and polyneuropathy. *Clinical Toxicology*, v.47, n.7, p.386-688, 2009.
- THOMSON, C., HAHN, C. Reflexes and motor systems. In.: THOMSON, C., HAHN, C. Veterinary Neuroanatomy: A Clinical Approach. First Edition. Elsevier, 2012. p.47-57.
- THRALL, M.A. Anemia Regenerativa. In: THRALL, M.A. 1ª. Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.89.
- TRAILOVIC, S.M., NEDELJKOVIC, J.T. Central and Peripheral Neurotoxic Effects of Ivermectin in Rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.73, n.5, p.591-599, 2011.
- TRAILOVIC, S.M., VARAGI, V.M. The effect of Ivermectin on Convulsion in Rats Produced by Lidocaine and Strychnine. *Veterinary Short Communications*, v.31, n. , p.863-872, 2007.
- TURNER-LAWRENCE, D.E., KERNS, W. Intravenous Fat Emulsion: A Potential Novel Antidote. *Journal of Medical Toxicology*, v.4, n.2, p.109-114, 2008.
- TVEDTEN, H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In.: WEISS, D.J., WARDROP, K.J. Schalm’s Veterinary Hematology. Sixth Edition. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p.153, 157.
- UTU-BAKU, A.B. Effect of Therapeutic and Toxic Doses of Ivermectin (Mectizan) on Total Serum Protein and Hepatic Enzymes of Wistar Albino Rats. *International Journal of Biological Chemistry*, v.3, n.4, p.142-147, 2009.
- VERNAU, K.M., OSOFSKY, A., LECOUTEUR, R.A. The Neurological Examination and Lesion Localization in the Companion Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*, v.10, n.3, p.731-758, 2007.
- WANG, F., CHEN, J., CHENG, H., TANG, Z., ZHANG, G., NIU, Z., PANG, S., WANG, X., LEE, F.S. Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, v.28, n.5, p.627-639, 2011.
- WEINBERG, G., RIPPER, R., FEINSTEIN, D.L., HOFFMAN, W. 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., RIPPER, R., MURPHY, P., EDELMAN, L.B., HOFFMAN, W., STRICHARTZ, G., FEINSTEIN, D.L. 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., VADEBONCOUER, T., RAMARAJU, G.A., GARCIA-AMARO, M.F., CWIK, M.J. 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.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Certificado do CEUA

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b>
	<b>CEUA</b> COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
<b>UFMG</b>	
<b>CERTIFICADO</b>	
Certificamos que o Protocolo nº. 369 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Uso da emulsão lipídica intravenosa no tratamento da intoxicação por ivermectina ou deltametrina.", que tem como responsável MARILIA MARTINS MELO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 12/05/2015. Este certificado espira-se em 12/05/2020.	
<b>CERTIFICATE</b>	
We hereby certify that the Protocol nº. 369 / 2014, related to the Project entitled "Use of intravenous lipid emulsion in the treatment of ivermectin or deltamethrin poisoning.", under the supervision of MARILIA MARTINS MELO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 12/05/2015. This certificate expires in 12/05/2020.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 12/05/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a>	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a>	