

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES COM FOLHAS
VERDES DE *Nerium oleander* E USO DA FRUTOSE 1,6
DIFOSFATO E DA GLICOSE COMO TRATAMENTOS**

José Javier Mesa Socha

Médico Veterinário

Jaboticabal – SÃO PAULO – BRASIL

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES COM FOLHAS
VERDES DE *Nerium oleander* E USO DA FRUTOSE 1,6
DIFOSFATO E DA GLICOSE COMO TRATAMENTOS**

José Javier Mesa Socha

Orientador: Prof. Dr. Mario Roberto Hatayde

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Câmpus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SP

Março de 2011

Mesa Socha, José Javier

M578i Intoxicação experimental de cães com folhas verdes de *Nerium oleander* e uso da frutose 1,6 difosfato e da glicose como tratamentos / José Javier Mesa. -- Jaboticabal, 2011
xi, 48 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Mario Roberto Hatayde
Banca examinadora: Mirela Tinucci Costa, Wanderson Adriano Biscola Pereira
Bibliografia

1. Plantas tóxicas. 2. Arritmias. 3. Eletrocardiografia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615.918:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOSÉ JAVIER MESA SOCHA – nascido em Sogamoso (Colômbia) em 12 de Julho 1982. Filho de José Del Cármen Mesa Gómez e Maria Erlinda Socha Torres. Concluiu o Curso de Medicina Veterinária em Fevereiro de 2006, na Universidade Nacional da Colômbia. Posteriormente, realizou monitoria na Clínica de Pequenos Animais por seis meses no mesmo centro universitário como parte das exigências da graduação. Realizou estágio curricular na FCAV/UNESP/JABOTICABAL, no setor de Clínica Médica de Pequenos Animais durante o primeiro semestre do 2005 e atualmente desenvolve o curso de mestrado no programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Clínica Médica), desde 2009 na mesma faculdade sob a orientação do Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde.

"Fica proibido chorar sem aprender, acordar um dia sem saber o que fazer, tendo medo a tuas lembranças.

Fica proibido não sorrir aos problemas, não lutar pelo que queres, abandonar todo por medo, não converter em realidade teus sonhos.

Fica proibido não demonstrar teu amor, fazer que alguém pague tuas dúvidas e mal humor.

Fica proibido deixar a teus amigos, não tentar compreender o que viverão juntos, chamar-lhes só quando precisas deles.

Fica proibido não ser você na frente da gente, fingir na frente das pessoas que não te importam, te fazer o engraçado com tal que te lembrem, esquecer a toda a gente que te quer.

Fica proibido não fazer as coisas por você mesmo, não acreditar em Deus e fazer teu destino, ter medo da vida e seus compromissos, não viver cada dia como sim fora o ultimo suspiro.

Fica proibido não tentar compreender as pessoas, pensar que suas vidas valem mais que a tua, não saber que cada um tem seu caminho e sua felicidade.

Fica proibido não fazer tua historia, deixar de dar graças a Deus por tua vida, não ter um momento para a gente que te precisa, não compreender que o que a vida te da, também te o tira.

Fica proibido não procurar tua felicidade, não viver a vida com atitude positiva, não pensar em que podemos ser melhores, não sentir que sem você este mundo não seria igual"

Pablo Neruda

*Aos meus pais, José Mesa e Maria Socha por seu amor, dedicação e compreensão
Aos meus irmãos, Rocio e Liliana pelo incentivo e carinho
A minha amada esposa Maria del Pilar que adoro imensamente, por seu amor,
alegria, paciência, que me oferece, e por dar-me a felicidade de ter um filho.
A meu filho Juan José minha maior alegria e incentivo para viver.*

Dedico e Ofereço

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, entanto vejo teus olhos, sento minha alma a luz de teu olhar e minha alma se enche de uma paz e tranquilidade que me faz voar e imaginar que todo é felicidade.

Aos meus pais, porque uns bons Pais valem por cem maestros.

Aos meus irmãos, porque a forma como tratamos nossos pais e irmãos é a forma como iremos a tratar o mundo inteiro.

Ao professor Dr. Mario Roberto Hatayde, pela imensa oportunidade que me deu suas valiosas sugestões, orientação e exemplo de profissionalismo.

À professora Dra. Mirela Tinucci, por sua sabedoria, dedicação e amor que tem para ensinar e pela bonita amizade que me oferece.

Aos professores da UNESP, pelo apoio e ajuda no decorrer do mestrado.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Daniela Gomes da Silva, Wanderson Biscola Pereira, pela disponibilidade e valiosas sugestões que contribuíram para aprimorar este trabalho.

À UNESP e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Clínica Medica, pela oportunidade de crescimento científico que me proporcionaram.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos amigos do laboratório e colegas de Pós-graduação, Adriana, Carol, Beatriz, Edna, Sofia, Leandro, Guadalupe, Evandro, Marcio, Guido, José Beraldo, Chacal,

Denise, Daniel, Rafael, Llerme, Junior, Oniel, Zé, João, Claudia, Renata, Eugênio, Raul e outras tantas pessoas maravilhosas que conheci que me forneceram sua amizade e seu carinho, que fizeram esta experiência no Brasil uma beleza, vocês ficarão meu coração e falou adeus como se diz em minha terra que deus se os pague.

Aos meus compatriotas que moram em Jaboticabal, Orlando, Natalia, Edna, Yuri, Tia Helena, Andres, Luis, Diana, Astrid, Ivan, Pedro, Wilson, Enrique, Julian, Dunia, Karol, Fiona e a outros tantos que invadirão o Brasil.

"Deve evitar-se falar aos jovens do sucesso como sim se tratasse do principal objetivo na vida, A razão mais importante para trabalhar na escola e na vida é o prazer de trabalhar, o prazer do seu resultado e o conhecimento do valor desse resultado para sua comunidade”

Albert Einstein

"O ensino que deixa rastros não é a que se faz de cabeça a cabeça, senão de coração a coração”

Hendricks Howard G

"Lembrem que o eslabão mais alto que pode alcançar a espécie humana é ser revolucionário”

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Animais e instalações	10
4.2 Grupos experimentais e modelo de indução da intoxicação	10
4.3 Protocolos do tratamento	11
4.4 Tempos das avaliações	11
4.5 Laboratórios	12
4.5.1 Avaliação do quadro hematológico	13
4.5.2 Avaliações do quadro bioquímico sérico	13
4.5.3 Avaliação do urinálise e bioquímica urinária.....	14
4.5.4 Avaliação do clearance de creatinina	15
4.5.5 Avaliação da pressão arterial	16

4.5.6 Avaliação eletrocardiográfica	16
4.5.7 Avaliação histopatológica	17
4.6 Análise estatística	19
5. RESULTADOS	20
5.1 Exame físico e sinais clínicos durante a intoxicação	20
5.2 Resultados do hemograma	21
5.3 Resultados bioquímica sérica	23
5.4 Resultados da urinálise, enzimúria, clearance de creatinina e U-P/C	26
5.5 Resultados da pressão arterial	28
5.6 Resultados eletrocardiográficos	30
5.7 Resultados da histopatologia	34
6. DISCUSÃO	35
7. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Análise de Variância pelo teste de Fischer ($p < 0.05$), das médias dos valores dos hemogramas, tendo como fonte de variação os grupos (G); os grupos dentro dos animais (A(G)); os tempos (T); interação grupo por períodos (G*T); coeficiente de determinação (R²) e do coeficiente de variação (CV), de cães intoxicados com *N. oleander* – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011..... 22
- Tabela 2.** Valores médios e ± 1 desvio padrão (DP), da contagem global de Leucócitos (Le – $\times 10^3/\mu\text{L}$), hemácias (He – $\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (Hb – g/dl), hematócrito (Ht – %) e plaquetas (Plaq – $\times 10^3/\mu\text{L}$), nos tempos T0h, T4h, T24h, T48h e nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander* – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011..... 22
- Tabela 3.** Valores médios dos parâmetros bioquímicos e ± 1 desvio padrão (DP), nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander*. – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011..... 24
- Tabela 4.** Valores médios e ± 1 desvio padrão (DP), da dosagem da atividade séricas das enzimas CK e CK-MB em U/L, nos tempos T0h, T4h, T24h, T48h nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander* – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011..... 25
- Tabela 5.** Valores médios e ± 1 desvio padrão (DP), da U-P/C e das dosagens Ccr e GGT urinária com seu índice, nos tempos T0h, T4h, T24h e T48h nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander*. – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011..... 26
- Tabela 6.** Valores médios e ± 1 desvio padrão da mensuração da PAS Doppler (mmHg), PAS(mmHg), PAM, e PAD(mmHg), nos tempos T0h, T4h,

T24h, T48h nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander* – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011 28

Tabela 7. Valores médios e ± 1 desvio padrão, da mensuração: Pms, PmV, PR, QRS, RmV, QT e frequência cardíaca (Fc), e os valores da média nos tempos T0h ,T4h, T24h, T48h nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander*. – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011. 33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *N. oleander* em etapa de floração – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011 2
- Figura 2.** Estrutura química da digoxina e da oleandrina (Fonte: SAEED et al.1996) 3
- Figura 3.** Ilustração dos intervalos experimentais, indicando os tempos das avaliações clínicas e coleta das amostras 12
- Figura 4.** (A). Imagem fotográfica ilustrando o campo da biópsia renal. (B) Imagem fotográfica ilustrando da agulha tipo Trucut®, seta amarela indicando a porção onde fica o fragmento da biópsia – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011..... 17
- Figura 5.** Imagem ultrassonográfica do rim esquerdo que corresponde à zona anecogênica (**re**). No interior observa-se uma área hiperecogênica, entrando no pólo caudal do rim, que corresponde à agulha, Trucut®, para a obtenção do fragmento – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011. 18
- Figura 6.** Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta ponteadas na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para as Fc, no GI e GII, onde não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos. Controle pelo teste de Tukey – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011 21
- Figura 7.** Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta ponteadas na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para as PT, no GI e no GII, onde não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos. Controle pelo teste de Tukey – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011 23

- Figura 8.** Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta ponteadas na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para atividade sérica das enzimas CK e CK-MB, no GI e GII, onde não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos. Controle pelo teste de Tukey – *UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.* 25
- Figura 9.** Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta ponteadas na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para a U-P/C, Ccr, GGT urinária e seu índice. No GI e GII, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos. Controle pelo teste de Tukey – *UNESP, Jaboticabal – SP, 2011* 27
- Figura 10.** Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta ponteadas na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para as PAS Doppler, PAS, PAM e PAD, no GI e GII, onde não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$). Controle pelo teste de Tukey – *UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.* 29
- Figura 11.** Traçados eletrocardiográficos computadorizados obtidos na derivação II, na velocidade de 50mm/segundo. Traçado A corresponde a um cão do GI na hora zero com eletrocardiograma normal. Traçado B que corresponde a um cão do GII em T4h com bradicardia sinusal onde verificou-se Fc de 48 bpm. Traçado C num cão do GI em T24h observa-se um bloqueio atrioventricular intermitente de segundo grau mobitz tipo II, tipo A – *UNESP, Jaboticabal – SP, 2011* 31
- Figura 12.** Traçados eletrocardiográficos computadorizados obtidos na derivação II, na velocidade de 50mm/segundo. Traçado A de um cão do GI

intoxicado com *N. oleander* em T24h evidenciando complexos ventriculares prematuros de origem esquerdo. Traçado B de um cão do GII em T24h com uma taquicardia ventricular paroxística com dissociação atrioventricular. Traçado C verificou-se num cão do GII em T24h uma taquicardia sinusal com Fc de 162 btm. – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.32

Figura 13. Fotomicrografias do rim de cães intoxicados com *Nerium oleander*. (A) tempo T-7 (basal) de um cão G76, onde se observa uma seta indicando uma região verde no espaço intersticial que corresponde a uma fibrose túbulo intersticial focal . Obj. 40x . (B) Cão G76 nas 76 horas, sem alteração no glomérulo e com mínima fibrose túbulo intersticial focal (seta) Obj. 40x. UNESP, Jaboticabal – SP, 2011..... 34

ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanino aminotransferase
APPC	Centro de controle de intoxicações em animais
Bpm	Batimentos por minuto
Ccr	Clearance de creatinina endógena
CK	Creatinaquinase
CK-MB	Creatinaquinase fração MB
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação
CPPAR	Centro de Pesquisa Parasitologia e Sanidade Animal
ECG	Eletrocardiografia
EDTA–Na₂	ácido etilenodiaminotetracético dissódico
Fc	Frequência cardíaca
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
G	Gauges
G24	Grupo 24 horas
G76	Grupo 76 horas
GI	Grupo I
GFR	Taxa de filtração glomerular
GGT	Gamaglutamiltransferase
GGTU	gamaglutamiltransferase urinária
GII	Grupo II
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
HVGLN	Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IV	Via intravenosa
Kg	Quilograma
Le	Leucócitos

mg/Dl	Miligramma por decilitro
Mm	Milímetros
Ms	Milissegundos
NAG	N-acetil-glicosaminidase
Na⁺/K⁺	Bomba Sódio/Potássio ATPase
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PASd	Pressão arterial sistólica obtida pelo método Doppler
Plaq	Plaquetas
Pms	Duração da onda P
PmV	Amplitude da onda P
PT	Proteínas plasmáticas totais
PRms	Duração do intervalo PR
QRSms	Duração do complexo QRS
QTms	Duração do intervalo QT
RIA	Radioimunoensaio
RmV	Amplitude da onda R
STms	Duração do segmento ST
T0h	Tempo zero
T24h	Tempo 24 horas
T48h	Tempo 48 horas
T4h	Tempo 4 horas
T- 1	Um dia antes da intoxicação
T-7	Sete dias antes da intoxicação
UNESP	Universidade Estadual Paulista
U-P/C	Razão proteína/creatinina urinária
USP	Universidade de São Paulo

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES COM FOLHAS VERDES DE *Nerium oleander* E USO DA FRUTOSE 1,6 DIFOSFATO E DA GLICOSE COMO TRATAMENTOS

RESUMO-: O *N. oleander* é uma planta com ampla distribuição mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Esses arbustos são frequentemente usados como plantas ornamentais e possuem mais de 30 glicosídeos cardíacos, causadores do quadro clínico de intoxicação em caninos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações clínicas, eletrocardiográficas, bioquímicas, hematológicas e histológicas do rim e avaliar o efeito do uso da frutose 1,6 difosfato e da glicose como alternativas de tratamento em cães intoxicados com 0,25g/Kg de folhas frescas trituradas e adicionadas à ração em única dose. Foram utilizados 10 cães adultos, hípidos, sem raça definida, com 10 a 25Kg de peso, de 4 a 8 anos de idade. Foram distribuídos em dois grupos (GI e GII) com 5 animais cada. Para o GI o tratamento consistiu na administração de uma solução a 10 % de glicose a 50mg/Kg via intravenosa (IV) e em seguida uma infusão contínua a 10% de glicose IV por uma hora a 10ml/kg e GII recebeu frutose 1,6 difosfato, IV a 50mg/Kg, e em seguida uma infusão a 10% da mesma solução, durante uma hora a 10ml/kg. Nenhum dos animais do experimento veio a óbito e todos apresentaram sinais após a intoxicação como: vômito, sialorréia, náuseas, apatia, conjuntiva ocular congesta, desidratação, dor abdominal, tremores, diarreia, inapetência e tenesmo. Observou-se elevação principalmente da GGTU, CK e CKMB. Pela análise do eletrocardiograma encontrou-se arritmias como: bradicardia sinusal, bloqueios atrioventriculares de segundo grau, taquicardia ventricular paroxística e complexos ventriculares prematuros. Na histopatologia não se encontrou alterações no rim. Não observou-se diferença significativa entre tratamentos e na parte clínica houve melhora para GII observada no consumo de alimento. Concluiu-se com o presente estudo que animais intoxicados com 0,25g/Kg de folhas verdes de *N. oleander* em única dose, causa sinais clínicos, alterações laboratoriais e mudanças no traçado do eletrocardiograma. E o uso da frutose 1,6 difosfato e da glicose tiveram um comportamento similar para as variáveis estudadas durante o tempo experimental.

Palavras-chaves: arritmia, glicosídeos, biópsia, eletrocardiografia, intoxicação.

EXPERIMENTAL POISONING IN DOGS USING FRESH LEAVES OF *Nerium oleander* AND THE USE OF FRUCTOSE 1,6 DIPHOSPHATE AND GLUCOSE AS TREATMENTS

SUMMARY:- *N. oleander* is a plant with worldwide distribution, mainly in tropical and subtropical regions. These shrubs are frequently used as ornamental plants and have more than 30 cardiac glycosides that can cause poisoning in dogs. The objective of this study was to evaluate alterations in clinical, electrocardiographic, biochemical, hematological parameters, as well as kidney histology, and to evaluate the effect of the use of fructose 1,6 diphosphate and glucose as alternative treatments in dogs poisoned by 0.25 g/kg of fresh ground leaves added to the kibble in a single dose. Ten adult, healthy, mongrel dogs weighing 10 to 25kg and 4 to 8 years old were selected for the study. They were distributed into two groups (GI and GII) of 5 animals each. For GI, treatment consisted of intravenous (IV) administration of 50 mg/kg of a 10% glucose solution followed by continuous IV infusion of 10% glucose at 10 ml/kg for one hour. GII received a solution of fructose 1,6 diphosphate at a dose of 50 mg/kg intravenously followed by infusion of 10 ml/kg of the same 10 % solution for one hour. None of the animals died and all exhibited signs of poisoning as: vomiting, sialorrhea, nausea, apathy, conjunctiva congestion, dehydration, abdominal pain, tremors, diarrhea, loss of appetite and tenesmus. An increase in values of biochemical parameters, especially urinary γ -glutamyl transpeptidase (GGTU), creatinine kinase (CK) and myocardial bound creatinine kinase (CKMB) were mainly. The electrocardiogram revealed arrhythmias such as: sinus bradycardia, second degree atrioventricular block, paroxysmal ventricular tachycardia and ventricular premature complexes. No alterations were found for kidney histology. No significant difference was seen when comparing treatments. Clinically, there was improvement in feed consumption observed for GII. With the present study, it can be concluded that dogs poisoned by 0,25 g/kg of fresh leaves of *N. oleander* in a single dose will exhibit clinical signs, laboratorial alterations and changes in the electrocardiogram tracing. Likewise, the use of fructose 1,6 diphosphate and of glucose had a similar behavior for the variables studied during the experimental time.

Key words: arrhythmia, glycosides, biopsy, electrocardiogram, poisoning.

1. INTRODUÇÃO

As intoxicações tornam-se mais frequentes, apontando um notório acréscimo da casuística na rotina clínica de pequenos animais, principalmente pelo uso de produtos domissanitários e uso de plantas ornamentais tóxicas. Tanto os cães como os felinos podem potencialmente consumir as plantas ou parte desta, especialmente os filhotes devido a sua curiosidade. Em adultos a ingestão é causada por desordens comportamentais ou em animais famintos.

O N. oleander é amplamente usada como uma planta ornamental e ela provocam desordens cardiovasculares por seu conteúdo de glicosídeos. Existem algumas citações de intoxicações principalmente com folhas secas ou extratos, entanto que com folhas frescas não temos estudos apesar de que na atualidade existem aproximadamente umas 45 espécies de plantas que contem glicosídeos cardíacos que são potencialmente tóxicos para animais e humanos (EVERIST, 1982: MCKENZIE, 1994).

As plantas tóxicas geralmente desencadeiam quadros clínicos inespecíficos que podem ser confundidos com diversos tipos de intoxicações ou com outras doenças, o que poderia dificultar seu diagnóstico, somado ao desconhecimento que existe, nos mecanismos de ação, fisiopatologia, princípios ativos e terapêuticos existentes nestes tipos de intoxicações.

Por esses motivos, atualmente vem-se realizando diversas pesquisas a respeito, na tentativa de dispor ferramentas de estudo aos médicos veterinários e novas possibilidades de tratamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nerium oleander (Figura 1) é um arbusto amplamente utilizado como planta ornamental e distribui-se em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre. O *N. oleander* é conhecido popularmente como espirradeira, oleandro rosa, baladre, laurel de flor, adelfa; pertence à família *Apocynaceae*, a qual tem as seguintes características botânicas: formação de arbustos perenes, produção de folhas lanceoladas dispostas em espiral, cor amarelo a verde escuro, produção de flores em todos os meses do verão e presença de vagens com sementes (LANGFORD & BOOR, 1996).



Figura 1. *N. oleander* em etapa de floração – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

Ainda que a planta seja reportada como pouco palatável, ela pode ser ingerida por animais famintos ou entediados e causar intoxicação (LYNN & SAFDAR, 2006), pelos seus glicosídeos cardíacos os quais são quimicamente similares com a digoxina (Figura 2). Esses glicosídeos cardíacos podem ser encontrados em todas as partes da planta fresca ou seca (LANGFORD & BOOR, 1996; SOTO-BLANCO et al., 2006), no entanto as maiores concentrações encontram-se nas raízes e nas sementes, onde pode-se verificar até 30 tipos diferentes de glicosídeos cardíacos como: oleandrinas, digitoxigeninas e folinerinas. (IBRAHIM et al., 2008).

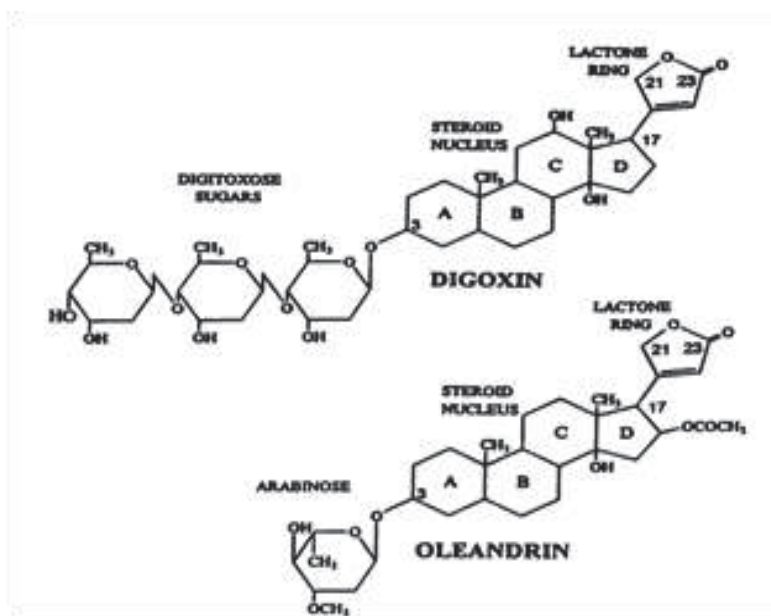


Figura 2. Estrutura química da digoxina e da oleandrina (Fonte: SAEED et al.,1996)

Sabe-se que a ingestão, inalação ou contato da planta com a pele e membranas mucosas causa sérios problemas como eritema bucal, dermatite por contato, náuseas, vômito, sialorréia, dores abdominais, cefaléia, alterações do estado mental, distúrbios visuais, midríase, neurites e principalmente sintomas cardiovasculares (HUGHES et al., 2002; ASLANI et al., 2007). Os sintomas cardiovasculares são dados pela presença dos glicosídeos cardíacos na planta, que são estruturalmente similares à digoxina e inibem a bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$, resultando na depleção intracelular de potássio e aumento do sódio intracelular. Estas alterações acarretam no acúmulo citoplasmático do cálcio, responsável pelo efeito inotrópico positivo. Este distúrbio eletrolítico afeta a condutividade elétrica do coração (LANGFORD & BOOR, 1996). Nestas condições, a resposta simpática também aumenta, sensibilizando o miocárdio e exacerbando todos os efeitos tóxicos dos glicosídeos (JOUBERT,1989; ASLANI et al., 2004). Devido à redução da condutividade elétrica no miocárdio, são observados bloqueios de condução, tais como arritmias ventriculares e eventualmente a perda completa da contratilidade (IBRAHIM et al., 2008).

Tanto em animais quanto em humanos, o potencial de exposição a estes glicosídeos é alto, tendo em vista a atratividade destes arbustos para proprietários de

casas e paisagistas, os quais usam com frequência estas plantas em projetos de jardinagem. Além disso, elas são usadas como cercas vivas como divisas em propriedades rurais (LANGFORD & BOOR, 1996). Por sua vasta utilização, muitos casos de intoxicação já foram relatados em bovinos, gatos, macacos, cães, cabras, patos, equinos (HUGHES et al., 2002; ASLANI et al., 2007), galinhas, canários, ratos e humanos. No caso deste último, os relatos foram de intoxicações por tentativas de suicídio (MARTINEZ, et al., 2007; MARIN et al., 2007; IBRAHIM et al., 2008).

As intoxicações com compostos digitálicos usualmente resultam da ingestão acidental de plantas contendo glicosídeos cardíacos, mas também pode ocorrer nas complicações em terapias com digitálicos (PLUMB, 1999), e em humanos por consumo voluntário (BLUM, & RIEDERS, 1987). Os sintomas podem ocorrer uma hora após ingestão e podem causar a morte (IBRAHIM et al., 2008).

ASLANI et al. (2004, 2007), realizaram algumas intoxicações de ovinos e caprinos com folhas secas de *N. oleander* em suspensão, administradas por via oral em dose única letal de 110mg/kg e verificaram que os animais intoxicados começavam a apresentar sinais clínicos de 30 a 60 minutos após a exposição. Esses sinais incluíam: atonia ruminal, timpanismo, dor abdominal, poliúria e taquiarritmias. Em outras espécies animais como: ratos, galinhas e canários, não foram observadas sensibilidade aos glicosídeos cardíacos de *N. oleander* (SZABUNIEWICZ et al., 1971). Outro estudo em ratos intoxicados experimental com folhas secas na quantidade de 10% do peso vivo por um período de seis semanas, observou-se que elas foram tóxicas, mas não letais aos ratos (AL-YAHYA et al., 2000). Os cães apresentam uma sensibilidade semelhante aquela encontrada em seres humanos intoxicados com *N. oleander*, possivelmente devido a uma estrutura similar da bomba de Na^+/K^+ -ATPase (SZABUNIEWICZ et al., 1971).

Nos Estados Unidos da América, o centro de controle de intoxicações em animais (APPC) notificou 71 casos de intoxicação por ingestão de *N. oleander*, mas existem poucos relatos em outros países (LYNN & SAFDAR, 2006).

Os principais sinais clínicos observados em animais intoxicados experimentalmente com *N. oleander* estão correlacionados com distúrbios dos sistemas: cardiovascular, gastrointestinal e nervoso, e evidenciando-se como sinais

clínicos: podem causar cólica, sialorréia, distensão abdominal moderada, diarreia, dor abdominal, inapetência (LANGFORD & BOOR, 1996; HUGHES, et al., 2002; LYNN et al., 2006), vocalização, convulsões e tremores musculares (LANGFORD & BOOR, 1996; ASLANI, et al., 2004). No eletrocardiograma, os achados mais frequentes são: bloqueio atrioventricular de primeiro e segundo grau, bradiarritmias, taquiarritmias ventriculares, depressão do segmento S-T, fibrilação ventricular e batimento ventricular prematuro (LANGFORD & BOOR, 1996; HUGHES, et al., 2002; LYNN et al., 2006).

Em relação à histopatologia do coração, os cardiomiócitos apresentam diferentes colorações (escuros e pálidos), associadas à degeneração inicial (SOTO-BLANCO et al., 2008). Além disso foi observada a presença de pigmentos de hemossiderina, congestão e hemorragias severas na região subendocárdio do coração, com vários graus de necrose nas células do músculo cardíaco (com infiltração de células inflamatórias mononucleares). No fígado, foi descrita degeneração gordurosa e infiltração de células inflamatórias no espaço portal, com necrose multifocal dos hepatócitos e hiperplasia de ducto biliar. Em relação ao sistema nervoso, relatos de caso em equinos têm mostrado congestão perivascular e edema perineuronal, focos hemorrágicos e presença de vários graus de isquemia celular (HUGHES et al., 2002; ASLANI et al., 2007).

Achados referentes à histopatologia do rim, mostraram que as células dos túbulos renais apresentaram degeneração e necrose nos túbulos contornados proximais e distais, com ruptura das membranas celulares e coloração basofílica dos núcleos. Alterações similares também foram observadas nos ductos coletores e elas sugerem dano ou doença renal de causa aguda (ASLANI et al., 2007). A IRA pode ter causas pré-renais, intrínsecas do rim ou pós-renais (STOKES & FORRESTER, 2004), neste tipo de intoxicações prevaleceriam às causas intrínsecas do rim. Na IRA há uma abrupta diminuição da taxa de filtração glomerular (GFR), resultando no acúmulo de toxinas urêmicas, dejetos metabólicos, disfunções metabólicas e desequilíbrio de fluídos ou eletrólitos com distúrbios ácido-básico. Os rins são particularmente susceptíveis à isquemia e dano tóxico, pois recebem 20% do fluxo cardíaco.

Estratégias para o diagnóstico precoce da doença renal estão baseadas em alterações que envolvem função renal que podem ser avaliadas por exames de urina e

de sangue. O urinálise tem grande utilidade para a detecção de proteinúria (que é uma manifestação de alteração na permeabilidade glomerular) e para detectar incapacidade de concentração da urina. As dosagens de creatinina e uréia no sangue são de grande utilidade como um índice indireto de GFR. Estes exames podem ser complementados por métodos mais precisos para a estimação da GFR (LEES, 2004), como o clearance de creatinina endógena (Ccr), estimada pelo volume do plasma no qual uma substância é removida pelo rim numa unidade de tempo. Este teste pode ser feito por diferentes técnicas chamadas: clearance de 20 minutos, em duplicata (duas vezes clearance de 20 minutos) e de 24 horas, sendo este último mais confiável, pois se obtém a dosagem da urina em 24 horas e fazendo só uma determinação de creatinina em plasma já que esta é relativamente constante num período de 24 horas (FINCO, 1995).

Outros exames são necessários para uma precoce detecção e conseqüente intervenção na tentativa de deter ou atenuar o dano túbulo intersticial e o desenvolvimento da insuficiência renal aguda (IRA) e azotemia (GRAUER, 2005). É o caso da enzimúria que está sendo usada em cães e gatos (UECHI et al., 1998), porém as enzimas mais comumente dosadas são a gamaglutamiltransferase urinária (GGTU), fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, n-acetil-glicosaminidase (NAG), entre outras que são encontradas no parênquima renal (CLEMO, 1998).

As enzimas originam-se de organelas celulares específicas como a GGT urinária formada na borda em escova dos túbulos proximais e a NAG na facção lisossomal, motivo pela qual numa lesão há liberação delas no lúmen e posteriormente são excretadas na urina. A GGT de origem hepático não é filtrada pelo glomérulo normal devido a seu alto peso molecular, podendo ser considerada como indicador específico de extravasamento ou necrose tubular aguda (GRAUER, 2005).

Entretanto os exames de enzimúria devem ser cuidadosamente interpretados por causa dos resultados falsos positivos, falsos negativos ou falhas na manipulação das amostras. Estes erros podem ser ocasionados, no caso de existir um dano glomerular, por hiperfiltração glomerular (resultando no aumento da filtração glomerular das enzimas séricas), esgotamento no estoque das enzimas tubulares, demora no tempo de processamento da amostra ou congelamento da amostra a -20°C ou -70°C (MATTEUCI et al., 1991; GRAUER, 2005).

Além disso, o cálculo da razão da atividade GGT urinária/creatinina urinária reflete a excreção de GGT urinária em 24 horas (UECHI, 1998). Com esta razão tenta-se corrigir as variações sobre a atividade enzimática que é causada pelo fluxo de urina, e relaciona-se com a concentração da creatinina urinária sendo dada como um índice de GGT urinária para a creatinina (WESTHUYZEN et al., 2003). Aumento de dois a três vezes o valor basal da razão da atividade GGT urinária/creatinina urinária são sugestivos de lesão renal.

Em muitas oportunidades a biópsia renal surge como uma alternativa para estabelecer o diagnóstico definitivo de lesão renal e a gravidade da lesão (VADEN, 2010). Na veterinária há ainda muita relutância para sua realização, pelo risco de complicações, custos com o procedimento e pela inadequada interpretação das biópsias. Alguns estudos confirmam baixas frequências de complicações na colheita do material para biópsia, assim como mínimo efeito quando técnica é adequadamente empregada (JERACK et al., 1982; DROST et al., 2000). Existem várias técnicas utilizadas para a realização das biópsias, entre elas estão: percutânea (por palpação direta, laparoscopia e ultrassonografia) e cirúrgica (biópsia incisional). A biópsia guiada por ultrassonografia é a técnica eleição quando os animais pesam acima de 5 Kg (VADEN, 2010).

Quanto ao diagnóstico das intoxicações por plantas que contêm glicosídeos cardíacos, este envolve a identificação da planta e a evidência do consumo desta, informações que são obtidas através da história clínica, sinais clínicos, achados do eletrocardiograma, alterações clínico-patológicas e achados de necrópsia, embora estes parâmetros muitas vezes não sejam suficientes para concluir o diagnóstico (HUGHES et al., 2002).

Na medicina humana, o radioimunoensaio (RIA) é utilizado para a monitoração das concentrações séricas das digoxinas e também para confirmar o envenenamento fatal em seres humanos por *Thevetia peruviana* (BREWSTER, 1986) e *N. oleander* (MARTINEZ et al., 2007; MARIN et al., 2007), já que os glicosídeos especialmente a oleandrina, cuja estrutura é similar à digoxina, apresentam reatividade cruzada com o exame RIA (CHEUNG et al., 1989; JORTANI et al., 1996). A cromatografia líquida por espectrofotometria de massa pode ser utilizada em alguns casos, na avaliação do

conteúdo gastrointestinal, fezes e sangue de animais e humanos (GALEY, 1996; IBRAHIM et al., 2008), mas por seu alto custo não é utilizada frequentemente na medicina veterinária (HUGHES et al., 2002).

O tratamento da intoxicação por *N. oleander* consiste em dar suporte com fluidoterapia via oral ou intravenosa para diminuir os efeitos cardiovasculares (HUGHES et al., 2002). Os fluidos que contém cálcio devem ser evitados, pois podem aumentar o efeito dos glicosídeos cardíacos no miocárdio (KNIGHT, 1988). Também doses repetidas de carvão ativado são empregadas para prevenir a reciclagem de toxinas entero-hepáticas (LYNN et al., 2006). Os medicamentos antiarrítmicos como: a atropina, atenolol, fentoína, procainamida e lidocaína, podem ser usados para controlar os efeitos dos glicosídeos cardíacos (JOUBERT, 1989; PLUMB, 1999). Contudo, deve se constatar o tipo de arritmia, realizando o exame eletrocardiográfico, durante vários dias (LANGFORD & BOOR, 1996).

Além do tratamento de suporte, foi demonstrado experimentalmente que a frutose-1,6 difosfato, previne danos no coração e o efeito de desbalanceamento dos íons em cães, ainda que o mecanismo de ação seja desconhecido. Cães intoxicados com extratos de *N. oleander*, foram tratados com dosagem de 50mg/kg frutose-1,6 difosfato, e em seguida utilizada uma solução a 10% do mesmo princípio em infusão constante, demonstrando que o coração dos animais tratados com frutose-1,6 difosfato voltaram ao ritmo normal, os níveis de potássio nos cães não sofreram alterações e a pressão foi mantida no nível da normalidade (MARKOV et al., 1999). Também outra opção na terapêutica, é a utilização de fragmentos de anticorpos de digoxina bem sucedida no tratamento experimental de intoxicação com *N. oleander* em cães (CLARCK et al., 1991; CAMPHAUSEN et al., 2005).

Embora existam os efeitos tóxicos do *N. oleander*, ela tem alguns compostos pesquisados atualmente, principalmente em medicina humana, no tratamento do câncer (PATHAK et al., 2000) e como protetores de células do cérebro em modelos de isquemia (THOMAS, 2006).

É assim que é relevante aprofundar na composição desta planta, seu mecanismo de intoxicação, doses tóxicas, alterações laboratoriais e formas de tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações clínicas, eletrocardiográficas, bioquímicas, hematológicas e histológicas do rim de cães intoxicados com 0,25g/Kg de folhas frescas trituradas de *N. oleander*, adicionadas na ração em dose única.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar os efeitos clínicos, cardiovasculares, urinários em cães submetidos a intoxicação com *N. oleander*, e tratamento com glicose e frutose 1,6 difosfato.
- Avaliar a função hepática, antes, durante e depois da intoxicação por meio da atividade dos biomarcadores, alanino aminotransferase (ALT), gammaglutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALP), PT e albumina.
- Avaliar a função renal, antes, durante e depois do tratamento, por meio da dosagem creatinina, uréia, razão proteína/creatina urinária (U-P/C), Ccr, atividade da GGT urinária, índice GGT urinária e urinálise.
- Verificar o perfil hematológico e eletrolítico pré e pós tratamentos.
- Monitorar a função cardíaca mediante dosagem de CK, CKMB, realização de eletrocardiografia e mensuração da pressão arterial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA), da Universidade Estadual Paulista, UNESP – *Câmpus* de Jaboticabal.

4.1 Animais e instalações

Para o experimento foram utilizados 10 cães adultos, hípidos, 5 machos e 5 fêmeas, sem raça definida, com pesos entre 10 e 25 Kg e de 3 a 6 anos de idade, provenientes do CPPAR, UNESP – Jaboticabal (Centro de Pesquisa, Parasitologia e Sanidade Animal), alojados individualmente em canis, equipados com comedouros e bebedouros individuais, no HVGLN, UNESP - Jaboticabal.

Todos os animais receberam a mesma dieta durante a realização do experimento, composta de ração comercial¹ uma vez ao dia e água *ad libitum*.

4.2 Grupos experimentais e modelo de indução da intoxicação

Os 10 animais foram distribuídos em dois grupos compostos por 5 cães cada um (dois fêmeas e três machos) (GI e GII), por delineamento inteiramente ao acaso. Os dois grupos receberam uma única dose de 0,25g/kg de peso, de folhas frescas de *N. oleander* seguindo o descrito na literatura para outras espécies (ASLANI et al., 2007; PEDROSO et al., 2009) e em animais testados em nosso piloto. No piloto foram usados três animais, os quais receberam 0,25g/kg, 0,5g/Kg e 1g/Kg, onde se observou que o animal que recebeu 0,25g/Kg apresentou sinais clínicos e eletrocardiográficos, num tempo inferior que outros animais do experimento.

As folhas usadas foram submetidas à avaliação botânica e foram obtidas da cidade de Jaboticabal, posteriormente trituradas, pesadas e embaladas individualmente em sacos plásticos seguindo a dose estipulada por Kg de peso, para ser adicionadas na ração no momento da alimentação.

¹ Puruca carne e vegetais BASA – Brasília alimentos S/A

Eles foram observados e avaliados clinicamente 24 horas pré-intoxicação e até 48 horas pós-intoxicação. Foi estabelecido o tempo zero (controle) e tomados esses dados como índices basais de cada animal, antes do fornecimento das folhas de *N. oleander* para realização do eletrocardiograma, exames hematológicos e bioquímicos. Para a histopatologia renal tomou-se como controle sete dias antes da intoxicação, com uma amostra por animal. Os mesmos animais foram submetidos à biópsia divididos em dois grupos sendo o grupo 24 horas (G24) e o grupo 76 horas (G76), baseado nos aumentos da GGT urinária verificados durante o experimento.

4.3 Protocolos do tratamento

Foram usados dois tratamentos duas horas após o consumo das folhas de *Nerium oleander*.

Para GI o tratamento consistiu na administração de uma solução de glicose² a 50mg/Kg via intravenosa (IV) e em seguida uma infusão a 10% de glicose IV por uma hora a 10ml/kg.

No GII foi realizado o tratamento com frutose 1,6 difosfato³, IV a 50mg/Kg, e em seguida uma infusão a 10% da mesma solução, colocada em cloreto de Na 0,9% durante uma hora a 10ml/kg.

4.4 Tempos das avaliações

Para a determinação dos valores basais (tempo 0 (T0h)), os parâmetros hematológicos, bioquímicos séricos, eletrocardiográficos, de pressão arterial, urinálise (cateterismo vesical) e exame físico foi obtido no tempo pré-experimental, com exceção para do Ccr, que foi determinado 24 horas antes (T-1). No tempo experimental foram determinados os tempos 4 horas (T4h), 24 horas (T24h) e 48 horas (T48h), onde foram colhidos amostras de hemograma, bioquímica sérica, pressão arterial, urinálise e os parâmetros clínicos. Para a realização da biópsia renal, considerou-se o tempo zero

² Glicose 10% Baxter Hospitalar Ltda. Brasil

³ Frutose 1,6 difosfato Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil).

sete dias anteriores à intoxicação (T-7) e os tempos experimentais foram T24h e T76h (Figura 3).

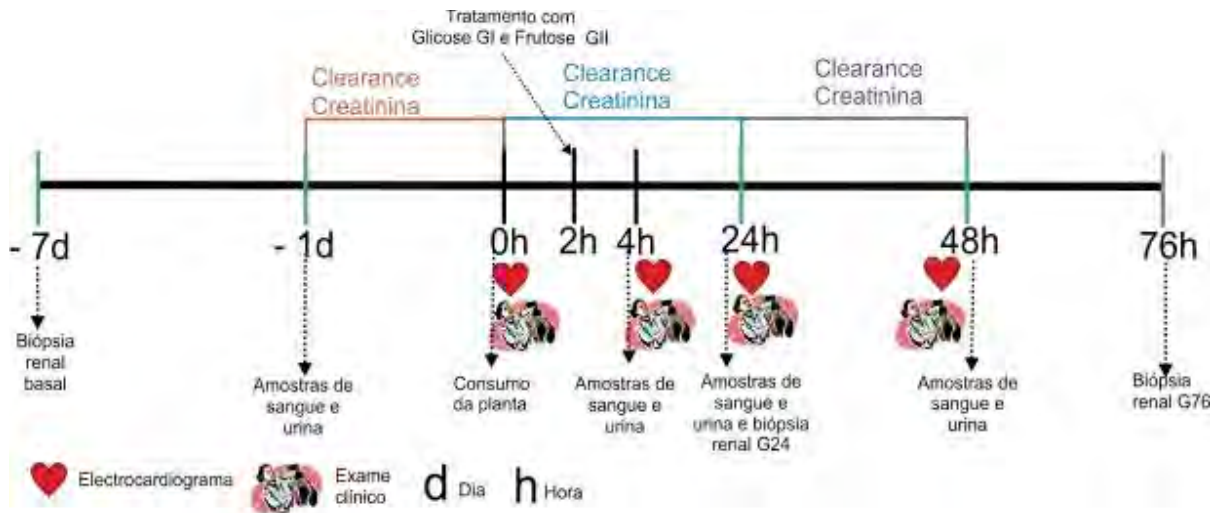


Figura 3. Ilustração dos intervalos experimentais, indicando os tempos das avaliações clínicas e coleta das amostras.

4.5 Laboratórios

Os estudos foram desenvolvidos no Laboratório de Cardiologia Clínica e Experimental e no setor de Radiologia e Ultrassonografia do Hospital Veterinário, para os exames de eletrocardiograma, aferição de pressão arterial não invasiva e ultrassonografia abdominal. Todos os setores e serviços citados são integrantes do HVGLN pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Outros exames como hemograma, urinálise, bioquímica-sérica e bioquímica urinária foram realizados no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirúrgica Veterinária pertencente ao Departamento de Clínica Veterinária, da mesma instituição.

Também utilizou-se o Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (FMRP/USP) para a realização da histopatologia das biópsias do rim.

4.5.1 Avaliação do quadro hematológico

Os hemogramas foram obtidos a partir de amostras de sangue, as quais foram colhidas com seringa por punção da veia jugular e colocadas em tubos devidamente identificados contendo em seu interior o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA-Na₂) a 10%, estas foram homogeneizadas e processadas. As contagens globais de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina, hematócrito e número de plaquetas foram obtidos num contador de células automático⁴. As contagens diferenciais dos leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com solução de Rosenfeld (JAIN, 1993).

4.5.2 Avaliações do perfil bioquímico sérico

Para avaliação da bioquímica sérica, foram realizados testes utilizando amostras de sangue total em tubos de ensaio sem anticoagulante, devidamente identificados. Após retração do coágulo, estas foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000rpm para a obtenção do soro e armazenadas em micro tubos tipo eppendorfs® a -20°C para posteriormente serem determinadas as concentrações séricas de: Creatinina (método Labtest), Uréia (método enzimático UV), GGT (metodologia Szasz modificado), ALP (metodologia Bowers e Mc Comb modificado), ALT (metodologia Cinética UV-IFCC), PT (método Biureto), Albumina (método verde de bromocresol), CK (método UV-IFCC) e CK-MB (método imunoinibição- IFCC), utilizando kits comerciais⁵ para seus processamentos, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro⁶ semi-automático, conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Para a leitura das concentrações séricas de sódio (Na⁺), cálcio (Ca²⁺) e potássio (K⁺), utilizou-se um aparelho automático de eletrodos íons-seletivos⁷.

⁴ Poch-100iVDiff, Sysmex – Japão

⁵ Labtest Diagnóstica – Lagoa Santa – MG – Brasil

⁶ Labquest – Labtest Diagnóstica – Lagoa Santa – MG – Brasil

⁷ Iselab 9580 – Drake – São José do Rio Preto – SP – Brasil

4.5.3 Urinálise, bioquímica urinária e proteinúria

Para avaliação da urina foi coletada, uma amostra de urina e processada num intervalo de tempo de 60 minutos após a colheita, utilizando-se fita reagente comercial⁸ e os parâmetros avaliados incluíram pH, glicose, proteína, urobilinogênio, nitrito, corpos cetônicos, leucócitos, sangue oculto e bilirrubina. Os valores da densidade urinária foram mensurados com a utilização de refratômetro digital aplicando-se uma gota da amostra de urina sobre o refratômetro⁹.

A análise sedimentoscópica das amostras de urina foi realizada após centrifugação¹⁰ a 1.500rpm durante dez minutos, o sedimento foi utilizado para confecção da lâmina. A lâmina foi preparada com uma gota do precipitado, logo recoberta com lamínula e analisada ao microscópio óptico¹¹. O exame físico da urina foi realizado por meio da observação macroscópica, estabelecendo-se resultados para aspecto e cor.

Para as análises bioquímicas urinaria foram feitas dosagens de proteínas, creatinina para posterior determinação do U-P/C, e GGT a partir do sobrenadante da mesma urina a qual foi resfriada a 4C° e processada nas primeiras duas horas para mensuração da GGT utilizando-se kits comerciais⁵. Também se realizou o cálculo para o índice da GGT urinária por meio da seguinte formula:

$$\text{Índice GGT urinária (U/g)} = \frac{\text{GGT urinária (U/L)}}{\text{Ucr (mg/dl)}}$$

U_{cr}= concentração urinária de creatinina

GGT urinária (U/L)= Atividade da GGT urinária

⁸ Combur10Test@UX – Boehringer Mannheim S.A. - Buenos Aires- Argentina

⁹ Refratômetro Digital – UGI (1,000-1,050) – Atago – Tóquio – Japão.

¹⁰ Centrífuga Celm LS3 Plus Barueri – SP - Brasil

¹¹ Microscópio Nikon Eclipse – E 200

A perda de proteína na urina foi estimada pelo cálculo da razão proteína/creatinina urinária (U-P/C). Para a determinação da U-P/C, foram feitas dosagens de proteína urinária pelo kit Sensiprot¹². U-P/C foi empregada à fórmula que segue:

$$U-P/C = \frac{\text{Proteína urinária}}{\text{Creatinina urinária}}$$

O dano glomerular foi considerado quando o valor estava $\geq 0,5$.

4.5.4 Avaliação do clearance de creatinina (Ccr)

A avaliação do Ccr foi realizada através da técnica de 24 horas conforme as recomendações feitas por FINCO (1995).

Durante todo o período de avaliação experimental os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas previamente higienizadas com água deionizada 24 horas antes do experimento. Os animais foram pesados e a região geniturinária foi higienizada durante a cateterização transuretral realizada no tempo inicial, meio e final da aferição da produção de urina, com cateter urinário de PVC número 6 ou 8, dependendo do tamanho do animal.

Após da remoção da urina existente na bexiga, com o auxílio de seringa acoplada à sonda, foram aplicados 10 a 20 mL de ar, para evacuar volumes residuais, sendo considerado o esvaziamento completo quando o volume de urina obtida não ultrapassasse 1mL. O momento do completo esvaziamento foi considerado como momento zero (T0h). Após 24 horas do esvaziamento foi registrado o tempo final para o Ccr e realizada a colheita de sangue (4mL). Toda a urina recuperada na gaiola a cada duas horas e junto com a urina no esvaziamento da bexiga foi homogeneizada para ser aferido o volume total.

Para os cálculos de Ccr utilizou-se a fórmula:

$$Ccr = \frac{U_{cr} \text{ (mg/mL)} \times U_v \text{ (mL)}}{S_{cr} \text{ (mg/mL)} \times T \text{ (min)}} / \text{peso}$$

¹² Labtest Diagnóstica – Belo Horizonte – MG – Brasil

Onde:

Ccr = clearance de creatinina

U_{cr} = concentração urinária de creatinina

U_v = volume de urina

S_{cr} = concentração sérica de creatinina

T = tempo em minutos

Os resultados finais foram expressos na unidade: mL/min/kg

4.5.5 Avaliação da pressão arterial

A pressão arterial (sistólica, média e diastólica) foi obtida por mensuração não-invasiva com aparelho tipo oscilométrico¹³. Os cães foram mantidos em decúbito lateral direito, com manguito de largura correspondente a aproximadamente 40% da circunferência do membro torácico esquerdo, colocado na região distal do rádio e ulna. Foram obtidas cinco determinações e os valores limítrofes superiores e inferiores descartados para a obtenção das médias mais exatas (MUCHA & CAMACHO, 2003). Mantendo o animal na mesma posição e sem retirar o manguito foi medida em seguida, com mais cinco aferições, a pressão arterial sistólica não invasiva pelo método Doppler vascular para posterior comparação com o método oscilométrico.

4.5.6 Avaliação eletrocardiográfica

Utilizou-se um eletrocardiógrafo computadorizado¹⁴ a partir das derivações periféricas (I, II, III, aVR, aVL, e aVF) e derivações precordiais (rV2, V2, V4 e V10).

Os eletrocardiogramas foram analisados na derivação bipolar II (DII), na velocidade de 50mm/seg, calibrado para um centímetro igual a 1mV, por um tempo de 4 minutos, onde tomaram-se três medidas de cada variável eletrocardiográfica e fez-se uma média destas três avaliações. Foram observadas as características do ritmo cardíaco e os parâmetros referentes à frequência cardíaca, duração (milissegundos – ms) e amplitude (milivolts-mV) da onda P, duração do intervalo PR e do complexo QRS,

¹³Dixtal® modelo DX2710 – Dixtal – Manaus – AM- Brasil.

¹⁴ ECG TEB para computador (ECG –PC, versão Windows XP – Tecnologia Eletrônica Brasileira – TEB - Brasil)

amplitude da onda R, duração do intervalo QT, características da polaridade da onda T, presença ou não de desnivelamento do segmento ST e valor em graus do eixo médio de QRS, obtido a partir das derivações I e III. As medidas eletrocardiográficas foram analisadas segundo a descrição feita por TILLEY (1985), com exceção da duração da onda P e do complexo QRS, onde foram seguidos os valores descritos por MUCHA & CAMACHO (2003).

4.5.7 Avaliação histopatológica

As biópsias renais foram feitas em três tempos (T-7, T24h e T76h) e realizadas pela técnica de biópsia percutânea com agulha cortante tipo Tru-cut®¹⁵ calibre 18 Gauges (G – 1.2mm x 13cm), guiada por ultrassonografia (Figura 4), com o objetivo de detectar lesões causadas pela intoxicação experimental e analisadas em conjunto com as demais provas de avaliações da função renal. Os animais foram preparados com tricotomia numa área de 8 cm de largura por 10 cm de comprimento do lado esquerdo na parte posterior da 13^o costela, e posicionados em decúbito lateral direito. A continuação na zona tricotomizada foi submetida à antissepsia com álcool 70% e fez-se a delimitação da região com dois panos cirúrgicos estéreis para isolar a pele (Figura 4).

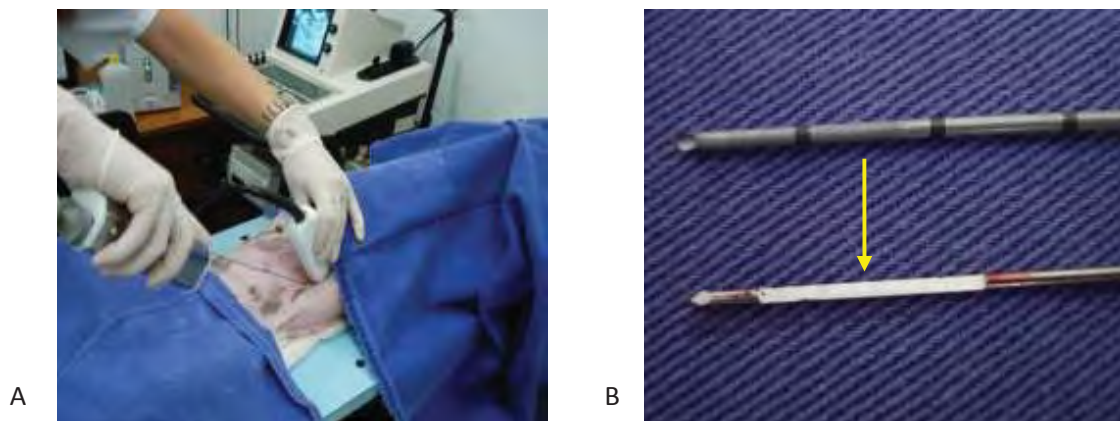


Figura 4. (A). Imagem fotográfica ilustrando o campo da biópsia renal. (B) Imagem fotográfica ilustrando da agulha tipo Trucut®, seta amarela indicando a porção onde fica o fragmento da biópsia – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

¹⁵ Trucut US BIOPSY- Franklin,USA

Para execução da técnica de biópsia renal percutânea, os animais foram levados à sala de ultrassonografia, onde receberam cloridrato de tramadol a 1mg/Kg por via intramuscular como analgesia e como anestesia Propofol¹⁶, na dose de 7mg/kg e manutenção de 3mg/kg, por via IV. Foi realizada então uma pequena incisão na pele na região abdominal com agulha 40x12, por onde a agulha tipo Trucut® foi introduzida, acoplada a uma pistola automática. Em seguida, introduziu-se a agulha no local incisionado, limitando a ponta da agulha no parênquima renal, no polo caudal, na tentativa de alcançar somente o córtex. Após o posicionamento apertou-se o gatilho e a agulha interna avançou 2 centímetros para o alvo (Figura 5), e retrocedeu rapidamente para dentro da agulha externa. Assim um fragmento de tecido de aproximadamente 15mm, ficou retido na reentrância da agulha interna. Retirou-se a agulha lentamente do alvo pressionando imediatamente o rim durante 5 minutos para evitar o risco de hemorragias. O paciente foi monitorado por ultrassonografia percorrendo a área, para detectar possíveis complicações.

Posteriormente retirou-se, a amostra da agulha para ser colocada numa solução de formalina ao 10%, e foi encaminhada ao Setor de Patologia, onde foi processada.

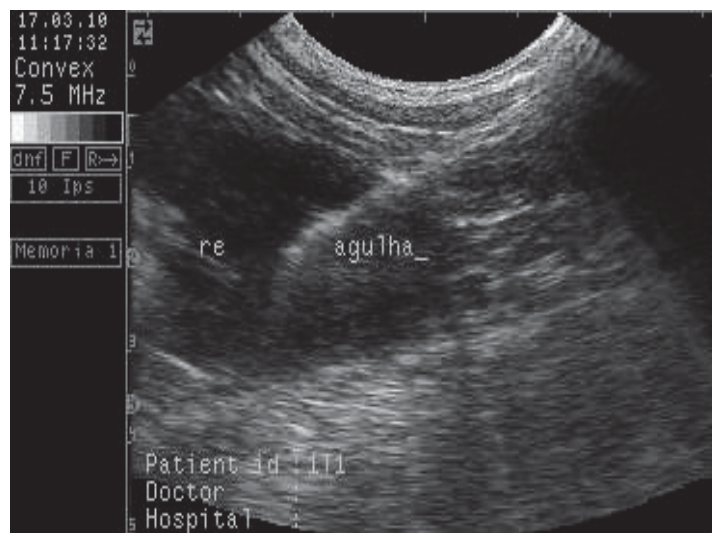


Figura 5. Imagem ultrassonográfica do rim esquerdo que corresponde à zona anecogênica (re). No interior observa-se uma área hiperecogênica, entrando no polo caudal do rim, que corresponde à agulha, Trucut®, para a obtenção do fragmento – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

¹⁶ Propofol Sandoz – Cambé, PR

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso com parcelas subdivididas, testando o fator grupo ou tratamento (2 níveis) nas parcelas e o fator tempo (4 níveis) nas subparcelas com cinco repetições dentro de cada tratamento (animais). Para os valores do teste de Fischer ($p < 0,05$), os efeitos de tempo e tratamento foram desdobrados, comparando a média pelo teste de Tukey, cujo nível de significância foi 0,05. Entre a comparação dos grupos, analisaram-se as variáveis não normais para os resultados das biópsias através do Teste não paramétrico U de *Mann-Whitney* e pelo Teste T *Student*, em uma prova bilateral com nível de significância de 5%. A análise da estatística foi realizada no programa Statical Analysis System – SAS (1996).

5. RESULTADOS

Nos resultados obtidos com este trabalho relatam-se os sinais clínicos apresentados durante a intoxicação com *N. oleander*. Além disso, são demonstradas algumas diferenças em parâmetros laboratoriais e eletrocardiográficas entre tratamentos e principalmente entre períodos. Os dados obtidos nesta pesquisa estão apresentados na forma de tabelas contendo as médias, valor médio dos desvios padrão das variáveis estudadas. Estas variáveis estão representadas em gráficos que mostram as medianas, os percentis de 25 e 75 e os valores máximos e mínimos em cada grupo. Nenhum dos animais do experimento veio a óbito.

5.1 Exame físico e sinais clínicos durante a intoxicação

Os dois grupos (GI e GII) consumiram a totalidade da mistura de ração com folhas verdes de *N. oleander* e os dois grupos apresentaram os mesmos sinais após a intoxicação, observados entre 30 e 90 minutos após o consumo. Os sinais foram: vômito em 100% (n=10 cães), sialorréia em 80% (n=8), náuseas, apatia, conjuntiva ocular congesta em 70% (n=7), desidratação 50 (n=5), dor abdominal, tremores 30% (n=3), diarreia 20% (n=2) e tenesmo 10% dos cães (n=1). A inapetência foi um sinal apresentado nos dois grupos após a intoxicação e posterior ao tratamento, encontrou-se que três animais do GI não consumiram a totalidade de sua ração no seguinte dia, entanto que no GII só um animal diminuiu o consumo. No GI os sinais posteriores ao tratamento se apresentaram até as 12 horas, entanto que para o GII foi até as 11 horas onde não houve diferença estatística significativa. Todos os animais vomitaram num intervalo de tempo entre 27 e 75 minutos.

Outras avaliações clínicas tais, como peso, temperatura, tempo de preenchimento capilar, cor das mucosas e frequência respiratória, não tiveram alterações importantes e mantiveram-se dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie canina. A Fc, dada em batimentos por minuto (bpm), não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos, mas mostrou uma importante diminuição nos dois grupos em T4h, (Figura 6).

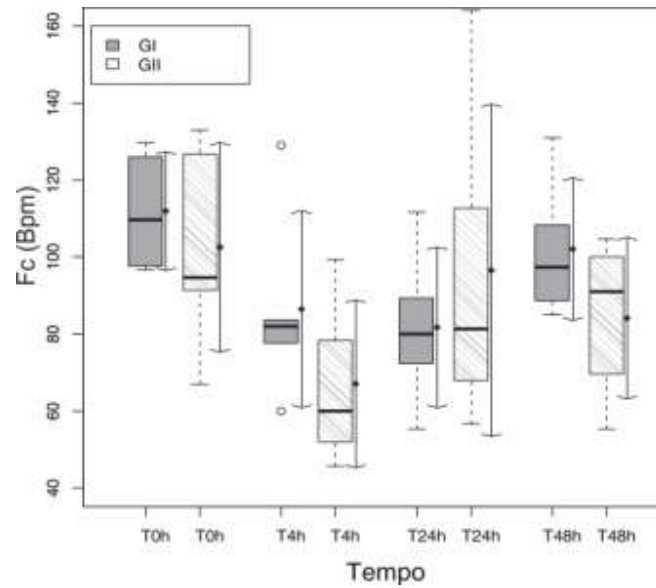


Figura 6. Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta pontuada na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para as Fc, no GI e GII, onde não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos. Controle pelo teste de Tukey – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

5.2 Resultados do hemograma

Os valores do hemograma nos dois grupos encontraram-se dentro da faixa de normalidade. Alguns parâmetros mostraram pequenas diferenças que foram evidenciadas por meio da análise de variância, indicando significância nas seguintes variáveis: He, Hb, Ht, neutrófilos (Ns) e Plaq onde apresentaram significância a 1% de probabilidade, na fonte de variação os grupos dentro dos animais. Nos grupos, houve diferenças significativa nas médias de ($p < 0,05$) para as variáveis He, Hb, Linf e Plaq. Também os Le, tiveram significância de ($p < 0,05$) na fonte de variação entre os animais. Nos outros parâmetros não foram observadas nenhuma interação significativa (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta dados das médias do hemograma e leucograma, com diferença entre tratamentos no T48h para Hb e Ht, com discreta diminuição nos valores destas variáveis no GII quando comparado com o GI.

Tabela 1. Análise de Variância pelo teste de Fischer ($p < 0,05$), das médias dos valores dos hemogramas, tendo como fonte de variação os grupos (G); os grupos dentro dos animais (A(G)); os tempos (T); interação grupo por períodos (G*T); coeficiente de determinação (R²) e do coeficiente de variação (CV), de cães intoxicados com *N. oleander* – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Níveis Mínimos de Significância (p)								
		Le	He	Hb	Ht	Ns''	Linf''	Eos''	Mon''	Plaq
(G)	1	0,0561	0,0043*	0,008*	0,005*	0,6120	0,7097	0,1810	0,0747	0,0216*
T	3	0,7861	0,0571	0,0598	0,0139	0,3703	0,0306*	0,1281	0,9244	0,2336
(A(G))	8	0,0003*	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**	0,0708	0,5021	<0,001**
(G*T)	3	0,5886	0,0762	0,0913	0,0725	0,3018	0,1766	0,9324	0,9244	0,8006
Erro (b)	24	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R ²		0,693	0,8411	0,8787	0,8787	0,8820	0,8820	0,5178	0,3522	0,9479
CV		21,151	7,549	6,6453	6,6453	0,9705	0,9705	18,418	14,44	8,6063

Médias seguidas pelos valores menores que 0,05 ($p < 0,05$) são valores significativos a 5% de probabilidade (*).

Médias seguidas pelos valores menores que 0,01 ($p < 0,01$) são valores significativos a 1% de probabilidade (**).

Valores transformados a logaritmos, Leos +1, Lnb +1, Llinf +1 e Lmon +1. (")

Tabela 2. Valores médios e ± 1 desvio padrão (DP), da contagem global de Leucócitos (Le – $\times 10^3/\mu\text{L}$), hemácias (He – $\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (Hb – g/dl), hematócrito (Ht – %) e plaquetas (Plaq – $\times 10^3/\mu\text{L}$), nos tempos T0h, T4h, T24h, T48h e nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander* – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011.

GRUPO		TEMPOS (Horas)				Valor de referência
		T0h DP	T4h DP	T24h DP	T48h DP	
Le	GI	10,02 Aa \pm 1,96	8,52 Aa \pm 1,75	9,20 Aa \pm 1,32	8,94 Aa \pm 1,81	6 – 18 $\times 10^3$ cel/ μL *
	GI	10,44Aa \pm 3,61	10,72Aa \pm 2,89	9,58 Aa \pm 3,27	11,22 Aa \pm 3,11	
He	GI	6,79 Aa \pm 1,00	6,06 Aa \pm 0,90	6,58 Aa \pm 1,02	7,03 Aa \pm 1,08	5,5 -8,5 $\times 10^6$ cel/ μL *
	GI	6,24 Aa \pm 0,84	5,92 Aa \pm 0,62	6,50 Aa \pm 0,81	5,88 Aa \pm 0,98	
Hb	GI	15,24 Aa \pm 2,48	13,70 Aa \pm 2,71	14,82 Aa \pm 2,57	15,84 Ab \pm 2,89	12 – 18 g/dl*
	GI	13,74 Aa \pm 2,15	13,14 Aa \pm 2,02	14,42 Aa \pm 2,09	13,18 Ab \pm 2,31	
Ht	GI	46,18 Aa \pm 6,88	40,64 Aa \pm 6,44	44,68 Aa \pm 6,29	47,08 Ab \pm 5,67	37 – 55 %*
	GI	42,00Aa \pm 5,49	39,50 Aa \pm 4,82	43,10 Aa \pm 5,17	39,58 Ab \pm 5,08	
Plaquetas	GI	241,000Aa \pm 61,15	231,000Aa \pm 72,56	217,800Aa \pm 80,15	240,600Aa \pm 102,01	180 – 400 $\times 10^3/\mu\text{L}$ *
	GI	240,600Aa \pm 140,19	245,400Aa \pm 117,16	283,000Aa \pm 91,25	306,800Aa \pm 164,39	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Valores de referência em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – HVGLN, UNESP, Jaboticabal.

5.3 Resultados bioquímica sérica

As dosagens bioquímicas de ALT, ALP, GGT, albumina, PT, creatinina, uréia, Na^+ , K^+ , Ca^+ , onde não mostraram diferenças significativas nas médias ($p < 0,05$) entre grupos GI e GII (Tabela 3), nem entre tempos em cada grupo. Além disso, os valores médios dos parâmetros avaliados permaneceram dentro dos limites fisiológicos estabelecido para cada espécie. Embora as PT não apresentem diferença significativa entre o grupo GI e GII, deve-se ressaltar que em T24h no GI, houve um moderado aumento nas médias quando comparada com o tempo T0h e T4h do mesmo grupo (Figura 7).

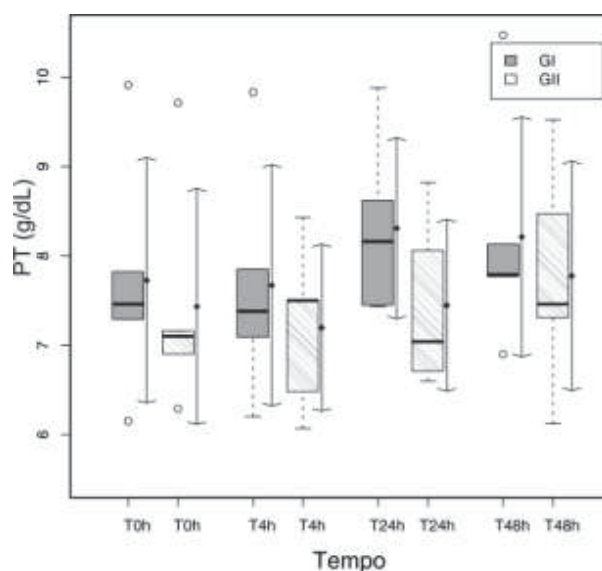


Figura 7. Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta pontuada na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para as PT, no GI e no GII, onde não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos. Controle pelo teste de Tukey – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros bioquímicos e ± 1 desvio padrão (DP), nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander*. – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011.

	GRUPO	TEMPOS (Horas)				Valor de referencia
		T0h DP	T4h DP	T24h DP	T48h DP	
ALT	GI	44 Aa \pm 27,62	56,57 Aa \pm 31,52	56,57 Aa \pm 27,82	58,66 Aa \pm 28,06	10 – 88 U/L
	GII	41,9 Aa \pm 29,4	44 Aa \pm 22,41	41,91 Aa \pm 14,34	34,06Aa \pm 3,33	
Albumina	GI	2,5 Aa \pm 0,59	2,57 Aa \pm 0,93	2,72 Aa \pm 0,6	2,66 Aa \pm 0,69	2,6 – 4,0 g/dl
	GII	2,39 Aa \pm 0,49	2,63 Aa \pm 0,58	2,43 Aa \pm 0,57	2,46 Aa \pm 0,47	
Ureia	GI	39,76 Aa \pm 5,2	36,48 Aa \pm 8,17	36,78 Aa \pm 3,63	37,83 Aa \pm 5,73	15 – 65 mg/dl
	GII	40,96 Aa \pm 4,71	29,04Aa \pm 4,62	35,3 Aa \pm 8,4	36,64 Aa \pm 7,75	
Creatinina	GI	1,09 Aa \pm 0,21	1,12 Aa \pm 0,18	1,05 Aa \pm 0,14	1,09 Aa \pm 0,19	0,5 – 1,5 mg/dl
	GII	0,9 Aa \pm 0,2	0,91 Aa \pm 0,23	0,82 Aa \pm 0,2	1 Aa \pm 0,06	
Na+	GI	147 Aa \pm 0,71	146,6 Aa \pm 2,07	144,4 Aa \pm 1,14	144,6 Aa \pm 1,67	146 – 156 mmol/L
	GII	146,4Aa \pm 2,88	143,6 Aa \pm 6,07	143,6 Aa \pm 6,19	147 Aa \pm 1,87	
K+	GI	4,69 Aa \pm 0,44	4,68 Aa \pm 0,33	4,9 Aa \pm 0,16	4,78 Aa \pm 0,33	3,8 – 5,1 mmol/L
	GII	4,74 Aa \pm 0,3	4,7 Aa \pm 0,24	4,88 Aa \pm 0,43	4,9 Aa \pm 0,34	
Ca+	GI	1,17 Aa \pm 0,08	1,16 Aa \pm 0,11	1,21 Aa \pm 0,04	1,16 Aa \pm 0,11	0,5 - 1,5 mmol/L
	GII	1,21 \pm 0,09	1,16Aa \pm 0,18	1,15 Aa \pm 0,13	1,18Aa \pm 0,07	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Valores de referência em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – HVGLN, UNESP, Jaboticabal.

Tanto a CK como a CK-MB não mostraram diferença significativa nos valores obtidos entre os grupos GI e GII, nem para tempos (Tabela 4). Observaram-se algumas alterações para a CK no grupo GI, onde aumentou moderadamente na comparação com os tempos T0h e T24h no mesmo grupo. No GII aumentou no tempo T4h quando comparado ao tempo basal. Também observou-se na atividade sérica da CK-MB aumento no tempo T4h, tanto em GI como no GII (Tabela 3).

Tabela 4. Valores médios e ± 1 desvio padrão (DP), da dosagem da atividade séricas das enzimas CK e CK-MB em U/L, nos tempos T0h, T4h, T24h, T48h nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander* – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011.

GRUPO	TEMPOS (Horas)								Valor referência
	T0h	DP	T4h	DP	T24h	DP	T48h	DP	
CK	GI	91,08Aa \pm 75,45		80,96 Aa \pm 49,21		161,94Aa \pm 65,24		116,38Aa \pm 71,20	20 - 200 U/L*
	GI	80,97Aa \pm 50,13		136,64Aa \pm 33,45		86,04Aa \pm 38,71		86,03 Aa \pm 43,39	
CKMB	GI	35,51Aa \pm 10,43		39,94Aa \pm 12,31		43,81Aa \pm 14,01		34,18Aa \pm 10,87	1,15 -28,4 U/L**
	GI	33,92Aa \pm 19,20		52,09Aa \pm 15,23		35,60Aa \pm 15,10		31,63Aa \pm 17,38	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Valores de referência em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – HVGLN, UNESP, Jaboticabal. ** Valores de referência CARDINET, (1997).

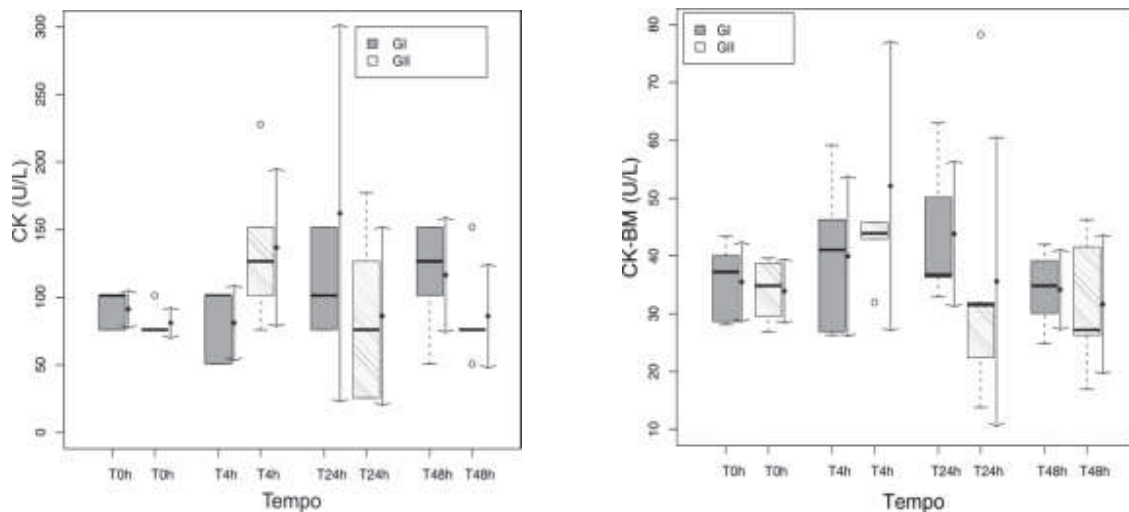


Figura 8. Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta pontilhada na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para atividade sérica das enzimas CK e CK-MB, no GI e GII, onde não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos. Controle pelo teste de Tukey – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

5.4 Resultados da urinálise, enzimúria, clearance de creatinina e U-P/C

No estudo dos parâmetros urinários, não foram constatadas alterações nas urinálises entre os grupos nem entre tempos. Os valores estavam na faixa de normalidade. Na razão U-P/C não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre grupos nem entre tempos. Na enzimúria foi analisada a GGTU e seu índice, onde não foi encontrada diferença significativa entre tratamentos, embora nos tempos verificamos aumentos nos dois grupos em T4h e T24h. No índice da GGTU houve um aumento significativo ($p < 0,05$) entre os tempos T4h e T24h para os dois grupos. E não observou-se diferença significativa entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios e ± 1 desvio padrão, da U-P/C e das dosagens Ccr e GGT urinária com seu índice, nos tempos T0h, T4h, T24h e T48h nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander*. – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011.

	GRUPO	TEMPOS (Horas)				Valor de referência
		T0 DP	T4 DP	T24 DP	T48 DP	
U-P /C	GI	0,25Aa \pm 0,17	Nr	0,20Aa \pm 0,15	0,30Aa \pm 0,19	<0,5*
	GII	0,25Aa \pm 0,18	Nr	0,35Aa \pm 0,19	0,46Aa \pm 0,18	
Ccr	GI	1,43Aa \pm 0,60	Nr	1,39Aa \pm 0,56	1,08Aa \pm 0,48	1,02- 3,46*mL/Kg/min
	GII	1,41Aa \pm 1,02	Nr	1,04Aa \pm 1,23	2,70Aa \pm 0,98	
GGT Urinária	GI	67,32Aa \pm 80,06	133,13Aa \pm 76,15	159,13Aa \pm 83,47	90,29Aa \pm 75,08	13–125 *U/L
	GII	58,14Aa \pm 97,16	116,28Aa \pm 95,01	123,95Aa \pm 92,26	90,28Aa \pm 88,82	
Índice GGTU	GI	50,25Aa \pm 160,51	265,43Ba \pm 173,21	164,34Ba \pm 156,83	42,32Aa \pm 182,09	31.6 \pm 10,4*
	GII	37,90Aa \pm 200,02	216,23Ba \pm 209,11	329,24Ba \pm 198,06	70,41Aa \pm 172,73	

Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas nas linhas diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Valores de referência em cães segundo GRAUER, (2005); NARITA et al., (2007); DE SCHEPPER et al., (1989). (Nr) Não realizado.

No Ccr também não houve diferença entre tratamentos, porém observou-se aumento em GI no T48h na comparação com os valores basais e com o GII na mesma hora (Figura 9).

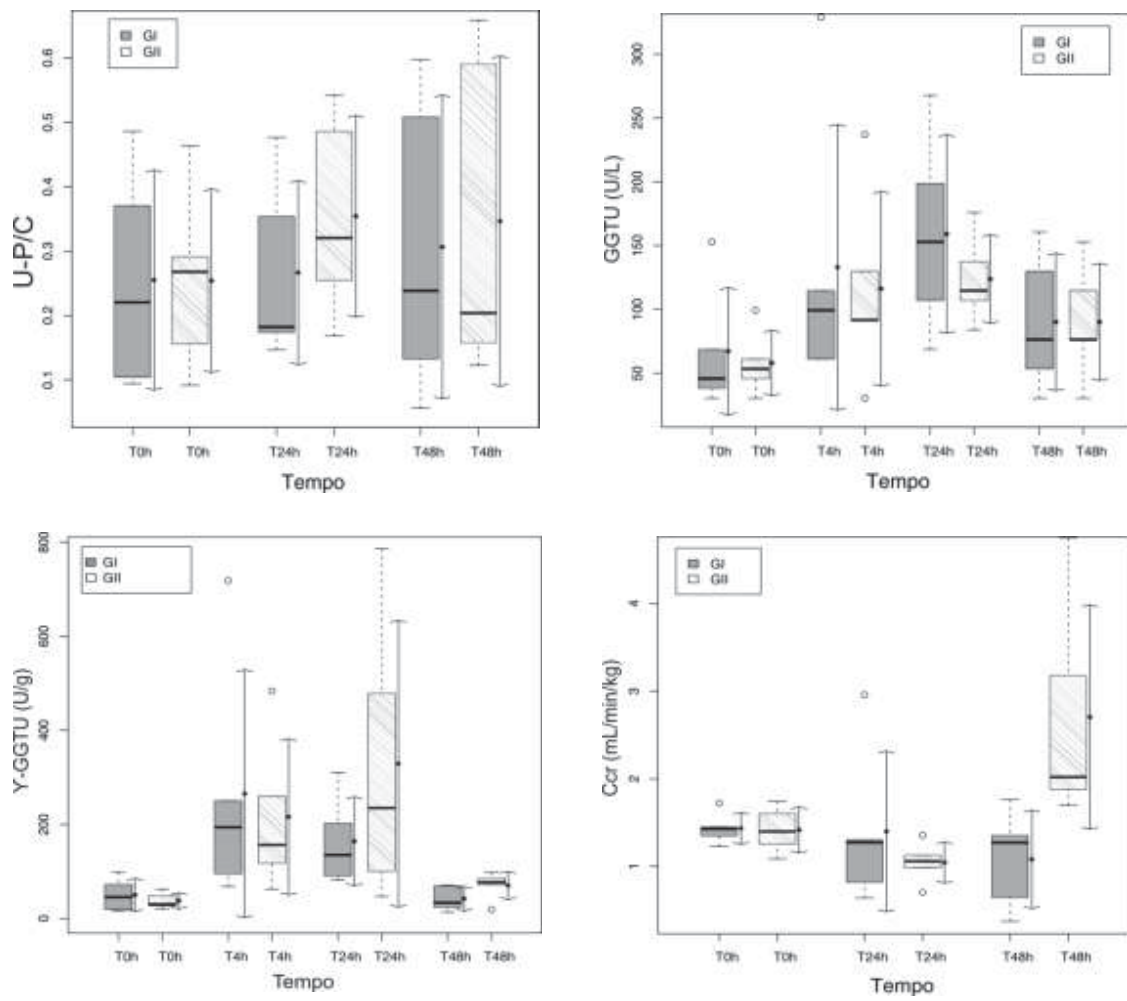


Figura 9. Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta pontuada na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para a U-P/C, Ccr, GGT urinária e seu índice. No GI e GII, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos. Controle pelo teste de Tukey – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

5.5 Resultados da pressão arterial

A pressão aferida pelo método Doppler não revelou diferença significativa entre os grupos nem entre os tempos, por outro lado o método oscilométrico apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nas médias entre os tempos T4h e T24h para as variáveis pressão arterial sistólica, pressão arterial média e pressão arterial diastólica (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios e ± 1 desvio padrão, da mensuração da PAS Doppler (mmHg), PAS(mmHg), PAM, e PAD(mmHg), nos tempos T0h, T4h, T24h, T48h nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander* – UNESP, Jaboticabal-SP, 2011.

	GRUPO	TEMPOS (Horas)				Valor de Referência
		T0h DP	T4h DP	T24h DP	T48h DP	
PAS Doppler	GI	142,33Aa \pm 15,52	140,33Aa \pm 13,20	126,33Aa \pm 16,09	138,66Aa \pm 18,21	145 \pm 23mmHg*
	GII	139,33Aa \pm 19,88	136,99Aa \pm 16,66	131,99Aa \pm 17,88	141,66Aa \pm 19,12	
PAS	GI	142,73Aa \pm 25,37	106,80Ba \pm 21,21	87,33Ca \pm 24,93	143,66Aa \pm 20,55	131 \pm 20mmHg*
	GII	142,40Aa \pm 26,26	104,60Ba \pm 29,27	87,26Ca \pm 25,64	146,13Aa \pm 29,33	
PAM	GI	104,20Aa \pm 23,60	82,00Ba \pm 23,9	143,40Ca \pm 24,03	103,06Aa \pm 25,37	97 \pm 16mmHg*
	GII	107,80Aa \pm 22,54	86,40Ba \pm 24,24	144,93Ca \pm 26,28	107,80Aa \pm 23,93	
PAD	GI	79,73Aa \pm 26,04	142,53Ba \pm 24,91	105,40Aa \pm 21,01	82,86Aa \pm 24,32	74 \pm 15mmHg*
	GII	92,00Aa \pm 25,75	144,26Ba \pm 21,19	103,93Aa \pm 22,77	81,33Aa \pm 25,33	

Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas nas linhas diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Valores de referência em cães segundo BROWN et al. (2007).

Nos gráficos observa-se uma diminuição moderada em GI e GII, para a PAS nos tempos T4h e T24h, porém a pressão média diminuiu no tempo T4h e aumentou no T24h para os dois grupos, enquanto que a pressão diastólica aumentou no tempo T4h para ambos os tratamentos. O método Doppler manteve valores muito similares durante todo o período experimental (Figura 10).

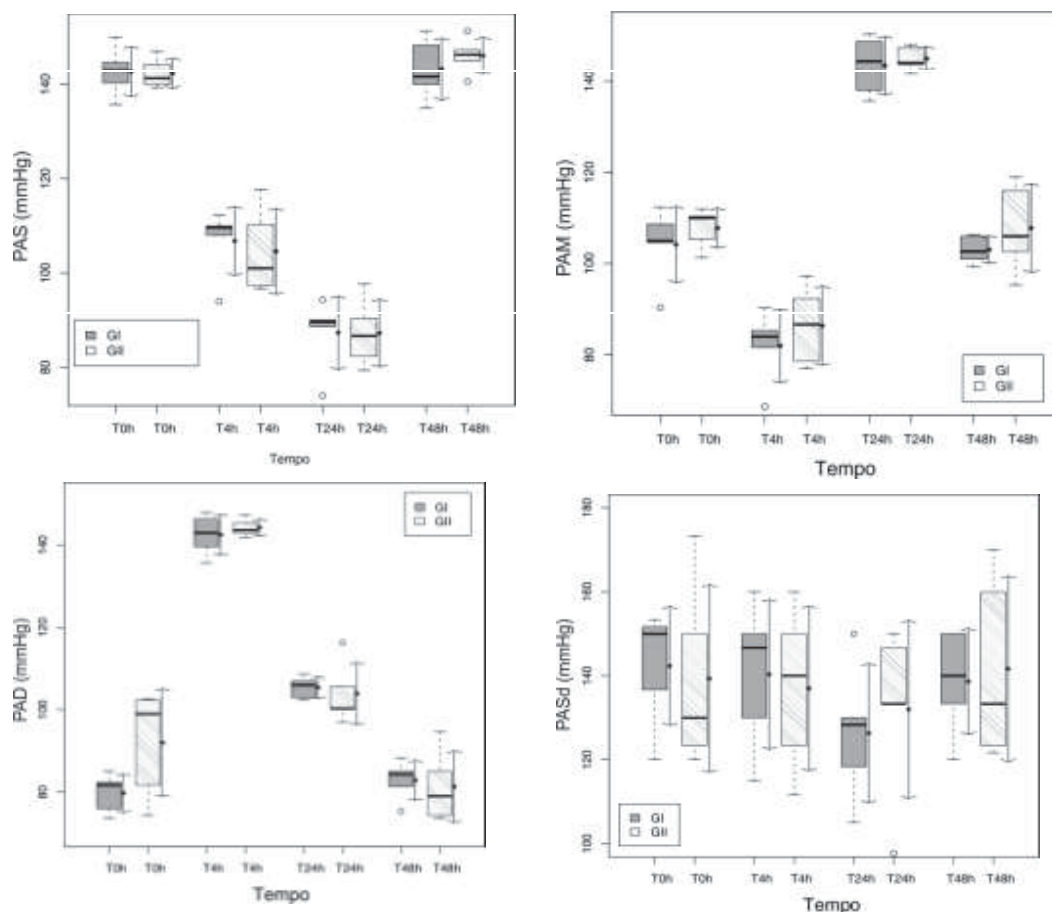


Figura 10. Representação gráfica por tratamento e tempo, ilustrando a mediana (linha preta dentro da caixa), primeiro e terceiro quartil (seta pontuada na metade da caixa), ± 1 desvio padrão (seta contínua lateral), média (ponto vermelho), obtidos para as PAS Doppler, PAS, PAM e PAD, no GI e GII, onde não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$). Controle pelo teste de Tukey – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

5.6 Resultados eletrocardiográficos

Na interpretação e análise eletrocardiográfica não houve diferença significativa entre grupos, nem entre tempos e foram encontrados diversos tipos de arritmias a partir do T4h até T24h, independente do tratamento, as quais se resolveram sem tratamento antiarrítmico nos dois grupos. As arritmias observadas foram bradicardia sinusal, bloqueios de segundo grau, complexos ventriculares prematuros, taquicardia ventricular e taquicardia sinusal (Figuras 11 e 12). Não houve diferença entre os grupos enquanto apresentação de arritmias.

À análise dos 10 cães do estudo se verificou que após a intoxicação 40% animais (n=4) apresentaram bradicardia sinusal (2 animais em cada grupo GI e GII), 20% (n=2) bloqueios atrioventriculares de segundo grau intermitentes (1 animal em cada grupo GI e GII), 10%(n=1) taquicardia sinusal (do grupo GI), 10%(n=1) taquicardia ventricular paroxística (do grupo GII) e 20% (n=2) complexos ventriculares prematuros(1 animal em cada grupo GI e GII).

Na Tabela 6 estão descritos as médias, os desvios padrão das variáveis eletrocardiográficas: duração da onda Pms, amplitude da onda PmV, intervalo PR, complexo QRS, amplitude da onda RmV, intervalo QT e Fc, as quais não foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$). Por outro lado, ao avaliar o intervalo QT, nota-se um aumento deste para GI no período T24h e no GII no período T4h, na comparação com seu respectivo T0H. No entanto, a Fc diminuiu no T4h em GI e GII (Tabela 7).



Figura 11. Traçados eletrocardiográficos computadorizados obtidos na derivação II, na velocidade de 50mm/segundo. Traçado A corresponde a um cão do GI na hora zero com eletrocardiograma normal. Traçado B que corresponde a um cão do GII em T4h com bradicardia sinusal onde verificou-se Fc de 48 btm. Traçado C num cão do GI em T24h observa-se um bloqueio atrioventricular intermitente de segundo grau mobitz tipo II, tipo A – *UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.*

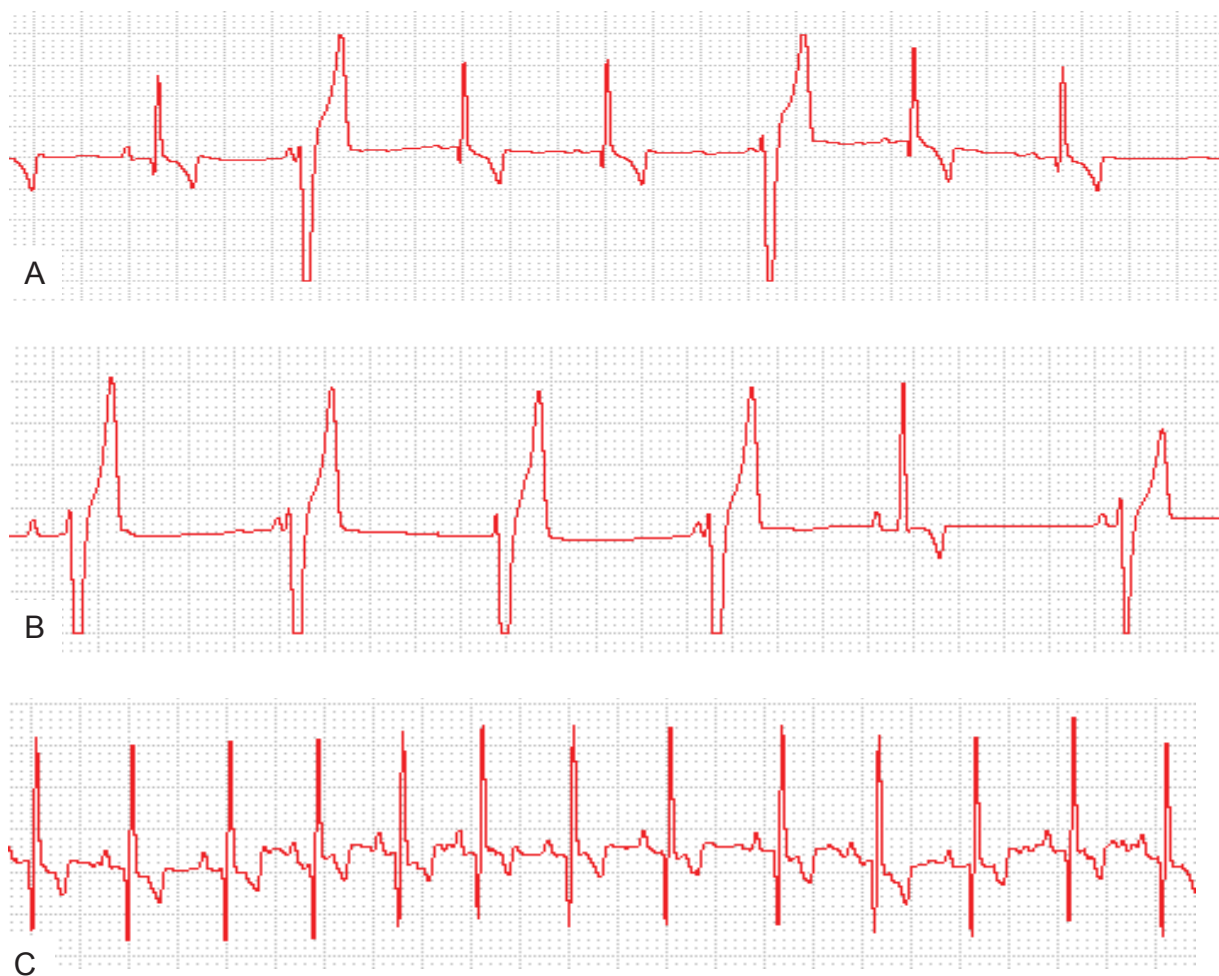


Figura 12 - Traçados eletrocardiográficos computadorizados obtidos na derivação II, na velocidade de 50mm/segundo. Traçado A de um cão do GI intoxicado com *N. oleander* em T24h evidenciando complexos ventriculares prematuros de origem esquerdo. Traçado B de um cão do GII em T24h com uma taquicardia ventricular paroxística com dissociação atrioventricular. Traçado C verificou-se num cão do GII em T24h uma taquicardia sinusal com Fc de 162 bpm. – UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

Tabela 7. Valores médios e ± 1 desvio padrão, da mensuração: Pms, PmV, PR, QRS, RmV, QT e frequência cardíaca (Fc), e os valores da média nos tempos T0h, T4h, T24h, T48h nos grupos GI e GII, de cães submetidos à intoxicação experimental com *N. oleander*.- UNESP, Jaboticabal-SP, 2011.

	GRUPO	TEMPOS (Horas)				Valor de referencia
		T0h DP	T4h DP	T24h DP	T48h DP	
Pms	GI	37,66Aa \pm 3,75	39,26Aa \pm 3,27	41,46Aa \pm 2,91	36,86Aa \pm 3,66	max 44,54ms
	GII	36,53Aa \pm 2,96	39,60Aa \pm 3,02	36,53Aa \pm 2,78	34,06Aa \pm 3,33	
PmV	GI	0,17Aa \pm 0,04	0,14Aa \pm 0,03	0,16Aa \pm 0,01	0,15Aa \pm 0,04	max 0.20mV
	GII	0,12Aa \pm 0,03	0,13Aa \pm 0,02	0,13Aa \pm 0,02	0,13Aa \pm 0,02	
PR	GI	92,46Aa \pm 5,49	98,93Aa \pm 4,89	112,46Aa \pm 5,99	119,60Aa \pm 5,24	60 a 130ms
	GII	89,46Aa \pm 14,98	113,80Aa \pm 15,01	100,60Aa \pm 14,07	104,73Aa \pm 13,20	
QRS	GI	51,80Aa \pm 2,86	51,86Aa \pm 2,88	53,06Aa \pm 2,91	50,40Aa \pm 2,77	54,78ms
	GII	50,86Aa \pm 4,80	50,06Aa \pm 4,37	51,33Aa \pm 4,28	49,26Aa \pm 4,91	
RmV	GI	1,44Aa \pm 0,39	1,41Aa \pm 0,31	1,40Aa \pm 0,28	1,27Aa \pm 0,37	2.5mv
	GII	1,30Aa \pm 0,36	1,22Aa \pm 0,30	1,36Aa \pm 0,27	1,20Aa \pm 0,35	
QT	GI	220,93Aa \pm 17,60	228,53Aa \pm 18,11	245,53Aa \pm 20,02	224,73Aa \pm 18,29	150-250ms
	GII	206,73Aa \pm 20,34	240,33Ba \pm 20,44	223,40Aa \pm 19,13	214,20Aa \pm 18,93	
Fc	GI	111,93Aa \pm 21,43	86,46Aa \pm 26,19	81,73Aa \pm 23,23	102,06Aa \pm 24,12	60 140 bpm
	GII	102,53Aa \pm 24,62	67,07Aa \pm 19,33	96,53Aa \pm 22,67	84,13Aa \pm 23,33	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Valores de referência em cães segundo TILLEY (1985); MUCHA & CAMACHO (2003).

5.7 Resultados da histopatologia

Na análise das biópsias não houve diferença significativa entre os grupos G24 e G76, quando é comparado com o tempo T-7 (basal), as alterações encontradas foram: mínima fibrose túbulo intersticial focal, vacuolização tubular difusa, degeneração hidrópica difusa (Figura 13.), as quais já estavam presentes no início do experimento. Foram realizadas duas biópsias por animal, para um total de 20 colheitas onde se observou as seguintes complicações: micro hematúria 100% (n=20), macro hematúria 20% (n=4), coágulos na bexiga 15% (n=3) e hemorragia perirenal 5% (n=1).

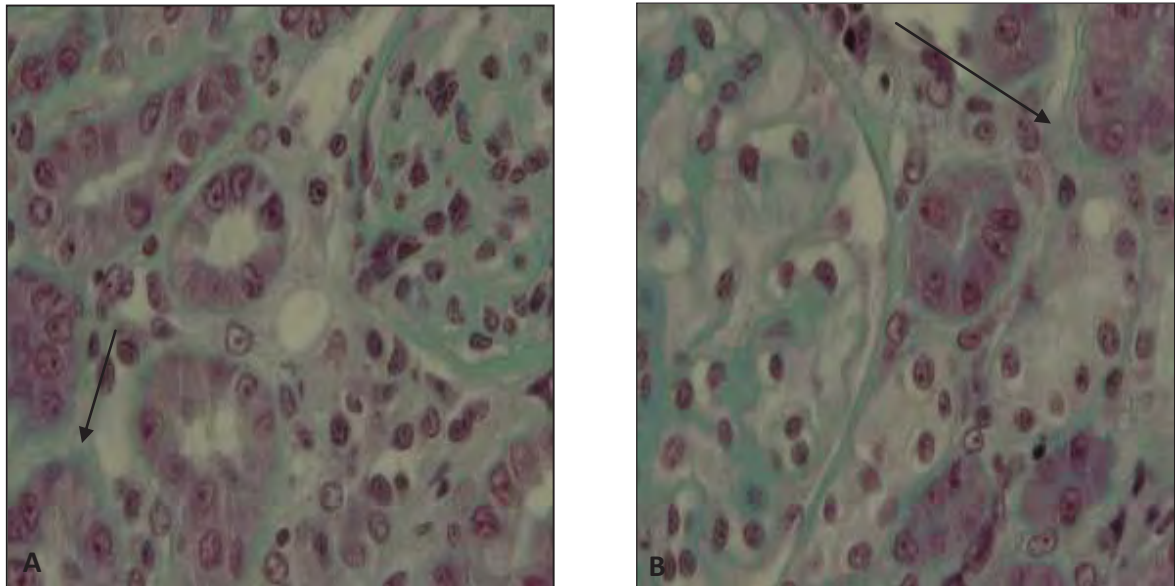


Figura 13. Fotomicrografias do rim de cães intoxicados com *Nerium oleander*. (A) tempo T-7 (basal) de um cão do G76, onde se observa uma seta indicando uma região verde no espaço intersticial que corresponde a uma fibrose túbulo intersticial focal. Obj. 40x. (B) Cão do G76 nas 76 horas, sem alteração no glomérulo e com mínima fibrose túbulo intersticial focal (seta) Obj. 40x. UNESP, Jaboticabal – SP, 2011.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que a intoxicação em cães com folhas verdes de *Nerium oleander* na dose de 0,25g/Kg não causou óbito, nestes animais nestas condições experimentais. Não há descrição de intoxicação experimental em cães com folhas verdes nestas dosagens. Alguns estudos realizados em cães utilizando principalmente as folhas secas ou extratos, onde isolaram um dos princípios ativos (oleandrina), este foi administrando diferentes concentrações causando sintomas de intoxicação (TRAUTVETTER et al., 1969; SZABUNIEWICZ et al., 1971; LEHMANN, 1984; CLARK et al., 1991). Pesquisadores (SZABUNIEWICZ et al., 1971; GALEY, 1996), consideram o *N. oleander* como uma planta extremamente tóxica e dosagens de folhas 0,05g/Kg do peso do animal podem causar a morte. Em nosso trabalho foram usadas dosagens de folhas 0,25g/Kg do peso do animal, sem levar ao óbito. Na literatura científica na medicina veterinária aparecem diversas citações que descrevem doses letais com folhas secas ou fazendo referência a número de folhas utilizadas para intoxicar, sem ter considerado as concentrações dos princípios ativos (HENNING, 1932; REZAKHANI & MAHAN, 1994), entretanto estas informações suscitam muitas controvérsias e são consideradas inapropriadas devidas a que variam dependendo do tamanho das folhas e de outras variáveis como: estação do ano, estágio do desenvolvimento da planta e condições do meio ambiente (JOUBERT, 1989). Neste estudo buscamos mimetizar a intoxicação natural, nós nos propusemos reproduzir a intoxicação de uma forma mais natural possível, com a justificativa de que a planta tem o princípio ativo a oleandrina e que na natureza ela esta composta por mais de 30 substâncias potencialmente tóxicas (MILEWSKY, et al., 2006) e esta disponível em jardins já que trata-se de uma planta ornamental.

Embora, na literatura se mencione a esta planta como pouco palatável, devido a seu conteúdo de saponinas (MACK, 1984), neste trabalho observamos que os animais consumiram a totalidade das folhas frescas trituradas que foram adicionadas a ração, este fenômeno possivelmente pelo fato de que a ração melhorou a palatabilidade e somado a este que os animais só consumiam alimento uma vez ao dia, motivo pelo qual eles na hora da alimentação estavam famintos e comiam vorazmente. Os cães são

considerados mais susceptíveis aos efeitos tóxicos dos glicosídeos cardíacos que os ruminantes (LANGFORD & BOOR, 1996), pois os poligástricos conseguem, por meio dos microorganismos ruminais, inativar uma proporção grande dos glicosídeos (ADAMS, 1995). Em nosso estudo evidenciou-se que ainda existindo essa suscetibilidade, os cães também apresentarão uma característica que seria benéfica, que é a facilidade com que eles podem ter êmese após o consumo da planta sendo uma vantagem em comparação com os poligástricos, diminuindo consideravelmente o tempo dentro do estômago e evitando desta maneira uma maior absorção da toxina. Deve-se lembrar que todos os animais do experimento vomitaram entre os 30 e 90 minutos, razão pela qual o grau de absorção e de intoxicação foi variável. MILEWSKI (2006), afirma que a gravidade, duração e início dos sinais clínicos depende da quantidade de toxina absorvida e do tratamento administrado.

Os sinais clínicos reportados neste trabalho são inespecíficos e podem ser confundidos com outros tipos de intoxicações, embora estes sinais ocorreram a pouco tempo após a ingestão das folhas. LANGFORD & BOOR (1996), mencionam em seu trabalho de revisão de literatura, sinais como: vômito diarréia, sialorréia, apatia, depressão do sistema nervoso central, hipotensão, membranas mucosas pálidas, tremores musculares, pulso irregular, diversas arritmias e coma, os quais foram observados também em nosso trabalho, mas sem ter consequências graves como: o coma ou óbito, provavelmente pela quantidade de toxina absorvida, como já foi descrito. Neste estudo clinicamente os animais que receberam a frutose 1,6 difosfato apresentaram uma melhora clínica na comparação com o grupo da glicose, fato evidenciado pelo retorno ao consumo de alimento novamente, observado em um número maior de animais no GII.

Nos resultados de laboratório a literatura cita hipercalemia (MARKOV, 1999), hiponatremia, hipocloremia, hemoconcentração, leucocitoses, elevação de uréia e creatinina no início do quadro clínico. Posteriormente hiperglicemia, hipoproteinemia, hipocalcemia e aumento da CK (HUGHES et al., 2002, PEDROSO et al., 2009). Em relação a estes parâmetros os animais neste estudo, não apresentaram essas alterações, salvo um aumento das proteínas plasmáticas totais no GI no T24h, devido ao fato que alguns animais desse grupo apresentaram algum grau de desidratação, que

contribuiu na elevação da média das proteínas. Os eletrólitos ficaram dentro dos valores de normalidade nos dois grupos, em comparação com alguns relatos de animais intoxicados naturalmente (HUGHES, et al., 2002), acreditamos que o balanço eletrolítico não se alterou, devido a um rápido início na hidratação, assim como pelo uso de frutose 1,6 difosfato no GII (MARKOV, 1999) e da glicose no GI, que puderam ter algum efeito benéfico. O uso da frutose em intoxicações por glicosídeos foi descrito inicialmente por MARKOV, (1999), ele demonstrou alguns resultados principalmente com o K^+ , onde observou-se captação celular de K^+ e normocalemia em cães intoxicados com oleandrinas após o uso do tratamento, fato esse também observado em nosso experimento.

No hemograma houve diferença estatística na média entre os dois grupos para os valores de He, Hb, Ht, essa diferença deve estar relacionada pelo pequeno número de animais no experimento e não podemos afirmar que por causa dos tratamentos preconizados, e sim estar associado também a outras causas como: stress dos animais durante o experimento e a colheita da biópsia a qual está relacionada, na apresentação de algumas complicações que poderiam levar a uma perda de sangue. VADEN, (2010) relata que existe de 1-18% de probabilidade de complicações nas biópsias sendo as mais frequentes microhematuria, macrohematuria, hematomas perirenais e em ocasiões marcada hemorragia.

A CK não apresenta diferença entre grupos encontrando-se dentro dos valores de normalidade, além disso, foi observado que no GII os animais voltaram rapidamente aos valores basais no decorrer do experimento. Com referência, o seu valor basal os grupos aumentaram levemente as concentrações da CK, este achado era esperado, devido ao fato da toxina produzir lesão nas fibras musculares esqueléticas e cardíacas (HUGHES, 2002). Neste estudo o aumento foi mínimo devido, a intoxicação foi leve e poucos animais apresentaram tremores musculares. Os tremores contínuos podem contribuir aos aumentos grandes da CK (HUGHES, 2002), o qual não foi observado. Na CKMB não tem sido realizados estudos dosando a enzima em caninos intoxicados com *N. oleander*, no entanto PEDROSO et al., (2009), realizou dosagem da CKMB em bovinos intoxicados experimentalmente onde observou aumento, na comparação com o basal. Neste estudo o aumento aconteceu em GI e GII, e iniciou-se no T4h, este achado

pode estar associado à lesão no miocárdio com necrose das fibras cardíacas que induz à liberação da isoenzima CKMB para o meio extracelular (DINIZ, et al., 2007).

Em relação aos parâmetros: U-PC, Ccr e urinálise não foram observadas alterações, as quais estavam condizentes com os achados da biópsia renal, onde não foram encontradas mudanças que indicaram necrose tubular aguda. Alguns autores encontraram em ovinos e caprinos, na avaliação histopatológica após o óbito, degeneração e necrose em dutos coletores, túbulos convolutos proximais e distais, caracterizada por ruptura de membrana celular, coloração basofílica nos núcleos e vacúolos citoplasmáticos sobre o epitélio celular (ASLANI, et al., 2007; BARBOSA, et al., 2007).

Apesar de ter encontrado algumas lesões nas biópsias em T24h e T76h como: vacuolização focal dos túbulos, degeneração hidrópica dos túbulos e fibroses intersticial, estas não foram provocadas durante a intoxicação, já que estas alterações foram observadas nas amostras basais em T-7, este resultado difere aos achados microscópicos de animais que morreram pela intoxicação com *N. oleander*, possível causa para esta alteração deve-se ao fato que o modelo de intoxicação utilizado não ocasionou um quadro grave de intoxicação, como também, para induzir lesão renal grave.

No entanto, na avaliação da enzimúria encontramos elevações da GGTU e seu índice no GI e GII no T4h e T24h, razão pela qual foram realizadas biópsias no tempo T24h na tentativa de encontrar lesões na histopatologia. Esta enzima é mensurada, pois clinicamente é útil na detecção precoce de lesão tubular no cão e no gato (UECHI, 1998). Recentemente demonstrou-se que as relações de GGTU/creatinina refletem a excreção em 24 horas de GGTU em cães. Grauer (2005), afirma que aumentos de duas a três vezes na relação de GGTU/creatinina sobre o valor basal são sugestivos de lesão tubular clinicamente relevante. Neste trabalho encontramos elevações de duas a três vezes o valor basal da GGTU e de seu índice sem ter alterações na histopatologia do rim, na uréia, creatinina, urinálise e Ccr. As causas desta elevação podem ser explicadas porque, apesar de sua utilidade, não há uma padronização da mensuração da atividade da GGTU motivo pelo qual existem diversas metodologias que são usadas (UECHI, 1998; NARITA, et al., 2005), o que poderia ter como consequência diferenças

no processamento das amostras, outra teoria que explicaria o aumento, é a possibilidade de existir lesão renal com extravasamento da GGTU, sem necessariamente causar lesão tubular ou levar a azotemia. O urinálise é um exame que oferece uma série de dados valiosos para o diagnóstico, mas neste caso não foi de muita utilidade, por ser uma intoxicação aguda que não possibilitou a de descamação celular ou de cilindrúria.

A pressão sanguínea tanto, pelo método Doppler e oscilométrico, neste estudo, se mantiveram dentro dos valores de referência durante todo o experimento. O método oscilométrico mostrou algumas variações nos tempos T4h e T24h onde houve redução da PAS e aumento da PAD, em GI e GII em relação a o método Doppler. Este comportamento esta associado às ações dos glicosídeos cardíacos que tem um comportamento similar a digoxina, que são compostos que aumentam o tono vagal, causando um maior efeito parassimpático e inibindo o tono simpático, que produz uma diminuição da frequência cardíaca e da PAS (MERRETT, 2000). Neste trabalho, seguiram-se como referência os valores utilizados por BROWN e colaboradores (2007), que classifica como hipertensão em cães valores acima de 145 ± 23 mmHg pelo método Doppler e pelo método oscilométrico para PAS de 131 ± 20 mmHg e PAD de 74 ± 15 mmHg.

Uma variedade de alterações eletrocardiográficas são mostradas na intoxicação com *N. oleander*, incluindo mudanças na duração dos complexos e arritmias como: bradicardia, bloqueios de primeiro e segundo grau, complexos ventriculares prematuros, taquicardia ventricular, taquicardia sinusal e fibrilação entre outros, os quais foram evidenciados neste trabalho. Estas arritmias são originadas pelo alto grau de inibição da bomba Na^+/K^+ ATPase nas fibras musculares cardíacas, condição que causa redução na atividade elétrica do miocárdio. A inibição da bomba Na^+/K^+ ATPase pelos glicosídeos resulta em acúmulo intracelular de íons de sódio. Por sua vez permite o fluxo de íons de cálcio intracelular e a liberação de íons de cálcio ligados ao retículo sarcoplasmático. O incremento das concentrações livres de cálcio no sarcoplasma causa maior força de contração do miocárdio, o efeito inotrópico positivo (JOUBERT, 1989). Além disso, induz de forma indireta a diminuição da condução elétrica no coração, pelo incremento da tonicidade no nervo vago (KATZUNG & PARMLEY, 1998;

PANWAR & GARG, 2000), que pode explicar a diminuição da frequência cardíaca no GI em T4h e no GII em T24h, e do aumento do intervalo Q-T evidenciados neste trabalho. Os compostos tóxicos da planta, por serem similares quimicamente com a digoxina e na farmacocinética, razão pela qual existem alguns fatores que alteram sua disponibilidade e que poderiam influenciar no grau de intoxicação do animal como: ser uma substância pouco lipossolúvel que causaria deposição na gordura e maior tempo para sua eliminação, ela pode ter menor absorção ao ser administrada com o alimento, animais com hipoalbuminemia pode diminuir a união e ter maiores concentrações em sangue e a hipocalcemia que diminuem a competição nos lugares de união e permitiria maiores quantidades séricas (MERRETT, 2000).

É necessária a realização de outros estudos para conhecer as concentrações dos glicosídeos cardíacos na planta e suas doses letais em cães.

7. CONCLUSÕES

- Com o presente estudo pode-se concluir que animais intoxicados com 0,25g/Kg de folhas verdes de *Nerium oleander* em única dose, causa sinais clínicos, alterações laboratoriais e mudanças no traçado do eletrocardiograma.
- O uso da frutose 1,6 difosfato e da glicose tiveram um comportamento similar para as variáveis estudadas durante o tempo experimental, excetuando uma melhora clínica observada no consumo do alimento, a qual foi melhor para a frutose 1,6 difosfato.
- O eletrocardiograma e mensuração da pressão fornecem uma avaliação do sistema cardiovascular, que mostra que as primeiras 24 horas nos animais intoxicados sofrem as alterações mais graves como hipotensão e arritmias.
- A GGTU e seu índice aumentaram na intoxicação com *N. oleander* desde a hora 4, sem ter diferenças entre os grupos nem ter variações em outros parâmetros como uréia, creatinina, urinálise, clearance, U-P/C e histopatologia.
- A intoxicação com *N. oleander* provocam vômito ao pouco tempo do consumo da planta o que tem como consequências diferentes graus de intoxicação.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, H.R. Digitalis and vasodilatador drugs. In: **Veterinary pharmacology and therapeutics**. Iowa. Ed. Iowa state university press. p. 455-463, 1995.

AL – YAHYA, M.A; AL-FARHAN, A.H.; ADAM, S.E.I. Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *Citrullus colocynthis* and *Nerium oleander* in rats. **Fitoterapia**, Milan, v 71, p. 385-391, 2000.

ASLANI, M.R.; MOVASAGHI, A.R.; JANATI-PIROUZ, H.; KARAZMA, M. Experimental oleander (*Nerium oleander*) poisoning in goats: a clinical and pathological study. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Islamic republic of Iran, v. 8, p. 58-63, 2007.

ASLANI, M.R.; MOVASAGHI, A.R.; MOHRI, M.; ABBASIAN, A.; ZAREHPOUR M. Clinical and pathological aspects of experimental oleander (*Nerium oleander*) toxicosis in sheep. **Veterinary Research Communications**. Amsterdam, v. 28, p. 609-616. 2004.

BLUM, LM.; RIEDERS, F. Oleandrin distribution in a fatality from rectal and oral *Nerium oleander* extract administration. **Journal Analytical Toxicology**, Niles, v. 11, p. 219-221, 1987.

BREWSTER, D. Herbal poisoning: a case report of a fatal yellow oleander poisoning in Solomon Islands. **Annals of Tropical Paediatrics**, London, v. 6, p. 289-291, 1986.

BROWN, S.; ATKINS, C.; BAGLEY, R.; CARR, A.; COWGILL, L.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOTT, J.; HENIK, R.; LABATO, M.; LITTMAN, M.; POLZIN, D.; ROSS, L.; SNYDER, P.; STEPIEN, R. Guidelines for the identification, evaluation and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 21, p. 542-558, 2007.

CAMPHAUSEN, C.; HAAS, N.A.; MATTKE, A.C. Successful treatment of oleander intoxication (cardiac glycosides) with digoxin-specific Fab antibody fragments in a 7-year-old child. **Zeitschrift für Kardiologie**, Darmstadt, v. 94, p. 817-823, 2005.

CARDINET, G.H. Skeletal muscle function, In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed, London: Academic Press, p. 407-440, 1997.

CHEUNG, K.; HINDS, J A.; DUFFY, P. Detection of poisoning by plant origin cardiac glycosides with the Abbott TDx analyzer. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 35 p. 295-297, 1989.

CLARCK, R.; SELDEN, B.S.; CURRY, S.C. Digoxin – specific Fab fragments in the treatment of *oleander* toxicity in a canine model. **Annals of Emergency Medicine**, Lansing, v. 20, p. 1073 – 1077, 1991.

CLEMO, F.A. Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog. **Toxicologic Pathology**, Philadelphia, v. 26, p. 29 – 32, 1998.

DE SCHEPPER, J.; DE COCK, I.; CAPIAU, E. Urinary gamma-glutamyl transferase and the renal dysfunction in 75 bitches with pyometra. **Research in Veterinary Science**. Oxford, v. 46, n. 3, p. 396-400, 1989.

DINIZ, P.P.V.P.; SCHARTZ, D. S.; COLLICHIO-ZUANAZE, R.C. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dogs: Two cases reports. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia**. Brasilia, v. 59, p. 85-89, 2007.

DROST, W.T.; HENRY G.A.; MEINKOTH J.H.; WOODS, J.P.; PAYTON M.E.; RODEBUSH, C. The effects of a unilateral ultrasound- guided renal biopsy on renal function in healthy sedated cats. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v. 41, p. 57- 62, 2000.

EVERIST,S.L. **Apocynaceae In: Poisonous plants of Australia**. Ed. Angus and Robertson. London, p. 77-89, 1981.

FINCO, D.R. Evaluation of Renal Functions. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**, Baltimore: Williams e Wilkins. p.221-224, 1995.

GALEY, F.D.; HOLSTEGE, D.M.; PLUMLEE, K.H. Diagnosis of *oleander* poisoning in livestock. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 8, p. 358-364, 1996.

GRAUER, G.F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 35, p. 581-596, 2005.

HENNING, M.W. Animal disease in South Africa, Ed. Gengra news agency South Africa. Gengra, 1932.

HUGHES, K.J. DART, A.J.; HOGSON D.R. Suspected *Nerium oleander* poisoning in a horse, **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 80, p.412-415, 2002.

IBRAHIM, A.; OMAR, Z.; NAWAL, A.; ANWAR, M. A fatal case of oleandrin poisoning. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 179, p.31-36, 2008.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JERACK, K.; OSBORNE, C.A.; STEVENS, J.B. Evaluation of renal biopsy in 197 dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.181, p. 367 -369, 1982.

JORTANI, S.A.; HELM, R.A.; VALDES, R. Inhibition of Na,K-ATPase by oleandrin and oleandrogenin, and their detection by digoxin immunoassays. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 42, p. 1654-1658, 1996.

JOUBERT, J.P.J. Cardiac glycosides. In: CHEEKE, P.R. (Ed.), In: **Toxicants of Plant Origin**, v II. CRC Press, Boca Raton, p.61-96, 1989.

KATZUNG, B.G.; PARMLEY, W.W. Cardiac glycosides and other drugs used in congestive heart failure. **Ed, Basic and clinical pharmacology**. Beirut, p. 197-216, 1998.

KNIGHT, AP. *Oleander* poisoning. **Compendium on Continuing Education for The Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 10, p. 262-263, 1988.

LANGFORD, S.D.; BOOR, P.J. *Oleander* toxicity: an examination of human and animal exposures. **Toxicology**, Amsterdam, v. 109, p. 1-13, 1996.

LEES, G.E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v.34, p. 867-885, 2004.

LYNN, M., AND SAFDAR, A. An overview of potentially life-threatening poisonous plants in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, San Antonio, v. 16, n.1, p. 25-33, 2006.

LEHMANN, VON H.D. Zur Wirkung pflanzlicher Glycoside auf Widerstandsgefäße und Kapazitätsgefäße. **Arzneim Forsch**. Berlin, v.34, p.423-429, 1984.

MARIN, M.; ARCE, A.; MARTINEZ, A.; MATEU, J. Diagnóstico de intoxicación por *Nerium oleander*: un único método analítico es suficiente. **Farmacia Hospitalaria**, Madrid, v 31, 2007.

MARKOV, A.K.; PAYMENT, M.F.; HUME, A.S.; RAO, M.R.; MARKOV, M.A.; SKELTO, T.N.; LEHAN, P.H. Fructose-1,6-diphosphate in the treatment of oleander toxicity in dogs. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhathan, v. 41, p. 9-15. 1999.

MARTINEZ, B.R.; FERRANDO, R.; MILARA, J.; SOLER, E. Intoxicación por *Nerium oleander* (baladre) de los casos clínicos. **Farmacia Hospitalaria**, Madrid, v. 31, 2007.

MATTEUCI, E.; GREGORY, G.; PELLEGRINI, L.; NAVALESI, R.; GLAMPIETRO, O. Effects of storage time and temperature on urinary enzymes. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.37, n. 8, p. 1436-1441, 1991.

MERRETT, D. Digoxin therapy. **Australian Veterinary Journal**. Victoria, v.78, p. 612-615, 2000.

MUCHA, C. J.; CAMACHO, A. A.; Determinação da Pressão Arterial. *In*: BELERENIAN, G. C.; MUCHA, Carlos J.; CAMACHO, A. A. **Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais**, São Caetano do Sul, SP., Ed. Interbook, p.216-229, 2003.

NARITA, T.; SATO, R.; MOTOISHI, K.; TANI, K.; NAITO, Y.; HARA, S. The interaction between orally administered non-steroidal anti-inflammatory drugs and prednisolone in healthy dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science/The Japanese Society of Veterinary Science**, Tokyo, v. 69, n.4, p. 353-363, 2007.

PEDROSO, P. M. O.; BANDARRA, P. M.; BEZERRA, P.S.; RAYMUNDO, D. L.; BORBA, M.R.; LEAL, J. S.; DRIEMEIER, D. Intoxicação natural e experimental por *Nerium oleander* (Apocynaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, Brasilia, v. 29 (5), p. 405-408, 2009.

PHATAK, S.; MULTANI, AS.; NALAYAN, S.; KUMAR, V.; NEWMAN, R. Anvirzel™, an extract of *Nerium oleander* induces cell death in human but not murine cancer cells. **Anti-Cancer Drugs**, Oxford, v. 11, p. 455-463, 2000.

PLUMB, D.C. **Veterinary drug handbook**. 3rd ed., Iowa: Iowa State University Press, p. 228-233, 1999.

REZAKHANI, A.; MAHAM, M. Oleander poisoning in cattle of the fars province, Iran. *Veterinary Human Toxicol.*, v. 34, p, 549, 1992.

SAEED A. J; ALLEN, R. H.; ROLAND, V. JR. Inhibition of Na, K – ATPase by oleandrin and oleandrigenin, and their detection by digoxin immunoassays. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 42, n. 10, p 1654 – 1658, 1996.

STOKES, J. E.; FORRESTER, A. D. New and unusual causes of acute renal failure in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, p. 909-922, 2004.

SZABUNIEWICZ, M.; MCCARDY, W.L.; CAMP, B.J. Treatment of experimentally induced *oleander* poisoning. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, Gent, v. 189, p. 12-21, 1971.

SOTO-BLANCO, B.; BARBOSA, R.R. AND FONTENELE-NETO, N.D. Toxicity in goats caused by oleander (*Nerium oleander*). **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 85, p. 279-281. 2008.

SOTO-BLANCO, B.; FONTENELE-NETO, N.D.; SILVA D.M.; REIS P.F.C.C.; NOBREGA, J.E. Acute cattle intoxication from *Nerium oleander* pods. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 38, p. 451-454, 2006.

TILLEY, L.P. **Essentials of canine and feline electrocardiography**. 2^a ed., Philadelphia: Lea & Febiger, p. 57 – 384, 1985.

THOMAS, L. Cardiac glycosides could protect brain cells from stroke. **Lancet Neurology**, London, v. 5, p. 650, 2006.

TRAUTVETTER, E.; KASBOHM, C.; WERNER, J. Oleander poisoning with respiratory A V block in a dog. **Berlin Munich Tierarztl Wochenschr.** Berlin, v. 15, p. 306-308, 1969.

UECHI, M.; UECHI, H.; NAKAYAMA, T.; WAKAO, Y.; OGASAWARA, T.; TAKASE, K.; TAKAHASHI, M. The circadian variation of urinary N-Acetyl- β -D- Glucosaminidase and γ -Glutamyl transpeptidase in clinical healthy cats. **The Journal of Veterinary Medical Science/The Japanese Society of Veterinary Science**, Tokyo, v. 60, n.9, p. 1033-1034, 1998.

VADEN, S. L. Renal biopsy of dogs and cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, p. 11-22, 2005.

WESTHUYZEN, J.; ENDRE, Z.H.; REECE, G.; REITH, D.M.; SALTISSI, D.;MORGAN, T.J. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. **Nephrology Dialysis Transplantation**, New York, v. 18, p. 543-551, 2003.g