

## HEMOTOXICIDADE: POTENCIAL DE HEMÓLISE DE ANTIPARASITÁRIOS EM CÃES, FELINOS E EQUINOS.

BRUNO CABRAL CHAGAS<sup>1</sup>; LEANDRO AMERICO RAFAEL<sup>2</sup>; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER<sup>3</sup>; SERGIO JORGE<sup>4</sup>; MÁRCIA DE OLIVEIRA NOBRE<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [brunocabral.chagas@gmail.com](mailto:brunocabral.chagas@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [leandro\\_arvet@hotmail.com](mailto:leandro_arvet@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rodvaucher@hotmail.com](mailto:rodvaucher@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [sergiojorgever@hotmail.com](mailto:sergiojorgever@hotmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [marciaonobre@gmail.com](mailto:marciaonobre@gmail.com) (orientadora)

### 1. INTRODUÇÃO

O controle de endoparasitos é realizado por meio de produtos antiparasitários, os quais possuem uma ação direta ou secundária que culmina em uma parada de atividade ou eliminação dos agentes agressores (SCARAMOZZINO, P et al., 2018).

Como a paleta de parasitos é extensa entre espécies, gêneros e famílias, também são variadas as moléculas utilizadas no controle específico de cada um, abrangendo, lactonas macrocíclicas, organofosforados, carbamatos, formamidinas, avermectinas e também produtos com base em extratos em vegetais (CHAGAS et al., 2020).

O manejo de utilização deriva da necessidade de se aplicar corretamente o produto para que aja nos períodos em que o parasito esteja em uma fase de ciclo mais vulnerável, necessitando por vezes protocolos de 1 a 3 aplicações (DANTAS-TORRES et al., 2020).

A segurança para uso de drogas antiparasitárias de alta qualidade é de extrema importância dentro do cenário da clínica veterinária, visto que diferentes espécies possuem limiares diferentes de metabolização bem como de eliminação de compostos gerados pelo uso dos produtos (PAGE, S. W., 2008). Porém, por mais que exista uma gleba enorme de produtos disponíveis, os mesmos acabam indo de encontro ao problema do manejo de aplicação e resistência (MORAES e GEARY., 2020).

Devido ao fato dos antiparasitários, serem recomendados em protocolos com mais de uma aplicação, bem como administrados em diferentes fases de vida dos animais, devem passar por uma gama de testes pré-clínicos que atestem a seguridade do seu uso até alcançar um limiar baixo de toxicidade, a ponto de serem utilizados em sua espécie alvo da ação (BEBRYSZ, M. et al., 2021; WRIGHT I et al., 2018).

Um dos testes utilizados nessa análise de segurança é o teste de hemólise. A membrana da hemácia é composta em sua maioria por proteínas, contando ainda com lipídios e a menor parte de oligossacarídeos (AZEVEDO, M.R.A., 2019). No teste de hemólise avalia-se por meio da análise de absorbância o dano causado na membrana celular das hemácias bem como, desnaturação de proteínas liberadas e que podem ser analisadas pela dispersão das mesmas no meio, pela diferença de passagem de luz (SOUZA et al., 2022). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade hemolítica de 4 compostos antiparasitários em sangue de cães, felinos e equinos.

### 2. METODOLOGIA

Para os testes foram utilizados tres compostos: TT1 1: produto antiparasitário de controle comercial três compostos CA001 e CA002 e CA003 os quais serão apresentados sob forma de código por estarem em sigilo, um controle negativo contendo tampão fosfato (pH 7,2) e um controle positivo contendo um composto detergente. Para realização do teste de hemólise, foram coletadas amostras individuais de sangue venoso das espécies canina, felina e equina utilizando tubos com anticoagulante E.D.T.A, respeitando o volume de 4 mL do tubo. Para obtenção de uma maior quantidade de amostras, o sangue foi avaliado quanto as suas condições e ausência de agregação plaquetária, sendo então realizado uma homogeneização das amostras. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos para o preparo do concentrado de hemácias. Posteriormente a retirada do plasma, o concentrado de hemácias foi diluído em uma solução a 4 % (4% de concentrado de hemácias e 96 % de solução tampão fosfato salino com pH de 7,2, 1 mL do infranadante em 99 mL de tampão fosfato com pH 7,2). Desta solução, foram utilizados 450  $\mu$ L em tubos de 5 mL e mais 50  $\mu$ L dos produtos, Triton X-100 (controle negativo) e uma solução detergente como controle positivo Foram utilizadas três concentrações dos compostos testados 35% (0,35/1), 100% (1/1) e 200% (2/1) sendo todos os testes realizados em triplicata. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada em leitor de microplacas (Thermo plate/ TP-READER) a 650 nm, no qual foi avaliada a dispersão de hemácias no sobrenadante por absorbância sendo considerado absorbância 0 um valor sem presença de hemólise e qualquer valor acima de 0 presença de hemólise. Foi analisada primariamente a porcentagem de hemólise tendo como base as médias do controle positivo e através da utilização do software Graphpad Prism 5.0®, por espécie e optou-se pela análise estatística de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls, sendo que os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos, sendo os dados analisados separadamente por espécie. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nos valores expressos através da absorbância, foi possível notar que nas concentrações de 200% (Tabela 1), nenhuma amostra sanguínea testada de cães e gatos além do controle negativo conseguiu apresentar valores menores que 1,0. Demonstrando também valores maiores que 50% de hemólise, sendo que em felinos constatou-se valores acima de 90% (Tabela 2) de hemólise em todos os produtos testados. O valor de  $p$  apresentado na concentração de 200% foi igual 0,0001 para todos confirmando grande potencial de hemólise.

Na concentração de 100% (Tabela 1) o tratamento 1, em cães teve um grande valor de absorbância, sendo ainda maior em gatos com valores de 90% e 92% (Tabela 2) de hemólise nas espécies, denotando maior destruição celular. Já em equinos a realidade encontrada é outra, pois os valores de absorbância alcançaram ínfimos 12%, demonstrando que a espécie equina foi a menos afetada com a ação hemolítica do produto. Nesta concentração, os valores de  $p$  para as espécies felina e canina foram de 0,0001 e na espécie equina o  $p$  não foi significativo. O teste de hemotoxicidade enquanto avaliação pré-clínica, demonstrou valores altos de hemólise, em uma concentração comercial, já disponível ao uso. Cabe considerar que esta é uma concentração alta, a nível sanguíneo, visto que a dose

indicada é para administração oral, tendo ainda todo um processo de metabolização antes do contato e distribuição sanguínea. A hemotoxicidade está diretamente ligada a ação dos compostos nas células vermelhas do sangue, sendo relatados casos de consequentes hipóxias, falha na eliminação de metabólitos tóxicos, falha na distribuição de oxigênio e em graus mais avançados esplenomegalias (WRIGHT I et al., 2018).

A espécie felina como relatado, apresentou, altos índices de hemólise derivado do uso dos produtos antiparasitários. Os felinos, possuem uma sensibilidade maior sobre a metabolização de alguns compostos, em virtude de deficiências fisiológicas devido a baixa concentração de algumas enzimas como a glicuronil-transferase (OLIVEIRA et al., 2021).

Na concentração de 0,35 o produto CA001, galgou um valor de 61% de hemólise em felinos, já em cães somente 11% e nos equinos 74% (Tabela 2). Nesse caso, houve uma inversão da condição apresentada nas maiores concentrações, entre espécies, visto que a espécie equina exacerbou o encontrado nas maiores concentrações. Diversos relatos de intoxicações em equinos por antiparasitários já forma relatados, comumente envolvidos com a sobredosagem do indicado, sendo relatados sinais clínicos como depressão, ataxia, queda de lábios, reflexos ausentes ou seja, todos envolvido com sistema nervoso (FURR, M., 2015), sendo que a sua ação direta no sangue necessita ser explorada.

Tabela 1: Valores médios de absorbância de concentrado de hemácias de cães, felinos e equinos submetidos a teste de hemólise com 4 tratamentos antiparasitários, controle negativo e controle positivo, todos nas concentrações de 200%, 100% e 35%. 200%. Valores considerados estatisticamente significativos foram analisados por espécie separadamente.

Produtos/ Espécies testadas	Concentrações								
	Caninos			Felinos			Equinos		
	200%	100%	35%	200%	100%	35%	200%	100%	35%
CA001	1,45****	1,65****	0,20	1,90****	1,78****	1,03***	0,14****	0,35	0,80***
CA002	1,20****	0,80****	0,20	1,79****	1,69****	1,55***	0,12****	0,12	0,10
CA003	1,50****	0,90****	0,22	1,74****	0,95****	0,87*	0,15****	0,21	0,02
TT1	1,10****	1,17****	0,62	1,66****	1,45****	1,00**	0,12****	0,11	0,06
Ctrl -	0,05	0,04	0,02	0,07	0,06	0,05	0,02	0,00	0,00
Ctrl +	1,61****	1,69****	1,81	2,06****	1,98****	1,70***	1,13****	0,90**	0,14**

\*valores considerados estatisticamente significativos.

Tabela 2: Potenciais de hemólise expressos através de porcentagem em comparação ao controle positivo.

Produtos/ Espécies testadas	Concentrações								
	Caninos			Felinos			Equinos		
	200%	100%	35%	200%	100%	35%	200%	100%	35%
CA001	97	98	11	95	90	61	53	38	74

CA002	76	70	34	92	85	91	100	13	59
CA003	96	55	12	91	78	51	84	23	15
TT1	90	48	11	92	43	59	88	12	44
Ctrl -	3	3	1	3	3	3	2	0	2

#### 4. CONCLUSÕES

Os antiparasitários são importantes ferramentas no controle parasitário, porém, em relação aos resultados encontrados, foram observados níveis de hemotoxicidade elevado para as espécies canina, felina e equina, necessitando de mais estudos acerca de suas potencialidades e indicações de uso.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, M. R. A. **Hematologia básica: Fisiopatologia e diagnóstico laboratorial**. Thieme Revinter Publicações Ltda, 2019.

BEBRYSZ, M.; WRIGHT, A.; GREAVES, M.; DEULT, D. R.; HOPKINS, G.; GILDEA, E.; ABALLÉA, S. (2021). How pet owners choose antiparasitic treatments for their dogs: A discrete choice experiment. **Preventive Veterinary Medicine**, v196, p.105493, 2021.

CHAGAS, B. C; FERNANDES, D. W; NOBRE, M. O. Miíases cutâneas x carrapato marrom dos cães: desenvolvimento e controle. **Ciência Animal.**, p. 109-125, 2020.

DANTAS-TORRES, F.Recommendations for the diagnosis, prevention and treatment of parasitic infections in dogs and cats in the tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109167, 2020.

FURR, M. Equine Neurotoxic Agents. **Equine Neurology**, p.437, 2015.

NETO, H. D. C. A.; SOUSA, A. P.; MEDEIROS, M. A. A.; SOUZA ALVES, M.; ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA FILHO, A. A. Avaliação da citotoxicidade do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos. **Research, Society and Development**, v.11, n.7, p.31711729965-31711729965, 2022.

OLIVEIRA, C. F. A.; TAMEIRÃO, E. R.; GONZAGA, L. W. F.; CASTRO BARCELOS, L.; SILVA B. L.; TAVARES, I. C. FERRANTE, M. Principais fármacos e vias de administração utilizados em felinos. **PUBVET**, 16, 191, 2021.

PAGE, S. W. Antiparasitic drugs. **Small animal clinical pharmacology**, v. 2, p. 198-260, 2008.

SCARAMOZZINO, P.; CARVELLI, A.; IACOPONI, F.; LIBERATO, C.. Endoparasites in household and shelter dogs from Central Italy. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**. v.6, n.1, p.45-47, 2018.

WRIGHT, I.; ELSHEIKHA, H. Drug interactions amongst companion animal parasiticides. **Companion Animal**, v. 23, n. 6, p. 314-320, 2018.