



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**



**MODELO EXPERIMENTAL PARA VALIDAÇÃO DE  
INDICADORES DE LESÃO CARDIOTÓXICAS AGUDA E  
CRÔNICA EM OVINOS.**

Kelly Cristina da Silva Godoy

CAMPO GRANDE, MS

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS CURSO DE  
DOUTORADO**

**MODELO EXPERIMENTAL PARA VALIDAÇÃO DE  
INDICADORES DE LESÃO CARDIOTÓXICAS AGUDA E  
CRÔNICA EM OVINOS.**

***Experimental model for validating indicators of acute and chronic  
cardiotoxic injury in sheep.***

**Kelly Cristina da Silva Godoy**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alda Izabel de Souza**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Medicina Veterinária

CAMPO GRANDE, MS

2018

À minha mãe, que partiu cedo demais e me deixou a missão de continuar. Mãe, a vida segue, e você junto com ela em meu coração, obrigada por me inspirar, afinal invisibilidade não significa ausência. Amo você sempre e para sempre.

**Com amor e saudade dedico...**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me ampara em todos os momentos.

À minha mãe, que a sabedoria e a força dos seus ensinamentos me guiem por todos os caminhos, eu a amo e por você, mãe, caminhei até aqui, saudades eternas.

A Maria, minha luz, que tantas vezes dividiu o tempo e a tela para que pudéssemos ficarmos juntas, obrigada, saiba que meu amor por você é maior que “o infinito”.

Ao Márcio, meu companheiro de jornada, que demonstra apoio incondicional e respeito as nossas escolhas. Obrigada por jamais me permitir desistir.

Ao meu pai, Pedro Antônio, obrigada por me mostrar com simplicidade que todos somos capazes, mas que precisamos dedicação, amo você.

Ao meu irmão Wellington e a minha cunhada (irmã pelo destino), pelo apoio, incentivo e cuidados, aprendi a amá-los ainda mais.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alda Izabel de Souza, pelo apoio, dedicação, conselhos, “brincas”, e, principalmente, por respeitar e me mostrar cada momento de uma vida além do doutorado e por compartilhar generosamente seus conhecimentos.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr Ricardo Antônio Amaral de Lemos, o qual aprendi a admirar e respeitar, gratidão pela oportunidade, orientação, dedicação e paciência em todos os momentos.

A Franciela Pezarico, ao longo destes anos tantos sentimentos vivenciados, alegrias e tristezas compartilhados com respeito e carinho, gratidão pelo companheirismo e amizade.

Ao Sandro, agradeço-lhe por todos os dias de convivência com alguém de tamanha simplicidade e paciência.

A Stephanie e a Paula Leal que dividiram comigo finais de semanas e feriados que nos renderam muitas histórias. Gratidão e luz em seus caminhos.

Ao Paulo Henrique Braz, grata pelos incentivos em cada momento de desespero e alegria, mesmo distante.

A Tamires Ramborger, quantas horas ouvindo os ensaios intermináveis, me auxiliando e incentivando nas apresentações, muito obrigada.

Ao Gustavo Gomes, desde o estágio até o mestrado, sempre me auxiliando e apoiando nos projetos e escritas, muito obrigada.

A todos que foram residentes do laboratório (Tamires, Renata, Simone, Bruna, Gustavo, Alexandre, Polyanna, Andressa, Marcel e Murilo) e que compartilharam

almoços ao “pé da árvore”, obrigada pelas ajudas e incentivos no decorrer deste ciclo. Obrigada a equipe do laboratório de Patologia Clínica Veterinária e Anatomia Patológica pela ajuda na execução das análises desta pesquisa.

Ao Fernando e ao Ricardo, secretários da pós-graduação que procuraram sempre, com atenção, esclarecer com informações precisas todas as dúvidas.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul pela bolsa de estudos (Chamada FUNDECT N° 08/2015).

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho, muito obrigada, este foi um caminho impossível de ser percorrido sozinho, o apoio e o incentivo de cada um me permitiram continuar, obrigada por fazerem parte desta história. Este ciclo se encerra, mas o ciclo da vida é infindável e ela segue diferentes caminhos para todos nós, mas certamente as lembranças permanecem em nossos corações.

## RESUMO

**GODOY, K.C.S. Modelo experimental para validação de indicadores de lesão cardiotóxicas aguda e crônica em ovinos. 2018. 52p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil, 2018.**

O consumo de plantas tóxicas é uma das principais causas de prejuízos econômicos para a pecuária brasileira, por perdas da produtividade, redução dos índices reprodutivos ou morte dos animais. Dentre essas, a *Amorimia pubiflora*, que contém o monofluoracetato como princípio tóxico, destaca-se como a planta cardiotóxica, causadora de morte súbita, mais importante para a pecuária do Mato Grosso do Sul acompanhada da planta hepatotóxica *Vernonia rubricaulis*. Plantas que contêm monofluoracetato (MFA) são associadas com morte súbita em animais de interesse pecuário. As pesquisas com métodos de controle está ativamente em desenvolvimento. Um possível método de controle da toxicose causada por essas plantas é a identificação de animais relativamente resistentes aos efeitos de MFA através de exames de patologia clínica. Um dos objetivos desse trabalho foi desenvolver um modelo experimental para identificar ovinos resistentes ao MFA através da administração de doses não letais crescentes de MFA enquanto era feita a mensuração dos seguintes analitos: fração MB de creatina quinase (CK-MB), aspartato aminotransferase (AST) cálcio ionizado no sangue (BIC) e glicose no sangue (BG). Cinco ovinos (Grupo 1) receberam por via intraruminal doses de MFA diluído em água por seis períodos de 3-5 dias com intervalos de 10 dias entre cada período. Cinco ovinos controles (Grupo 2) receberam 10 ml, por via intraruminal, de água deionizada seguindo os mesmos períodos e intervalos usados nos ovinos do Grupo 1. Amostras de sangue foram colhidas de cada ovino no primeiro dia do experimento, imediatamente antes que MFA ou água deionizada fossem administrados e 48 e 120 horas após a coleta para determinação dos níveis de CK-MB, AST, cálcio ionizado e glicose. Os valores médios de cada analito para todas as ovelhas de cada grupo foram comparados usando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney com um intervalo de confiança de 5%. Os sinais clínicos, quando observados, incluíam anorexia, apatia, relutância em movimentar-se, incoordenação, tremores musculares, afastamento dos membros pélvicos e decúbito esternal. Os ovinos que morreram foram necropsiados. Nenhuma alteração macroscópica foi observada no coração. microscopicamente, as lesões cardíacas consistiam de focos de necrose aguda de cardiomiócitos. Os ovinos não desenvolveram resistência ao MFA após receberem várias doses não letais e não houve diferenças significativas entre os níveis de CK-MB, AST, cálcio ionizado e glicose entre os grupos. A detecção de ovinos subclínicamente afetados pelos analitos usados no presente estudo não foi eficaz. O uso de doses crescentes não letais de MFA, como as usadas neste experimento, permite a identificação da dose tóxica para cada ovino e também variações na susceptibilidade individual. Como mencionado as plantas tóxicas que contêm monofluoracetato causam em diversos países graves prejuízos econômicos. Diante disso, procurou-se determinar a quantidade de monofluoracetato presente em brotos, folhas maduras, folhas velhas e sementes de *Amorimia pubiflora* colhidas em diferentes épocas do ano e seu efeito tóxico em ovinos. As folhas de *A. pubiflora* foram separadas de acordo com o estágio vegetativo (brotos, sementes, folhas maduras e velhas), dessecadas e fornecidas em doses diárias equivalentes a 5 g/kg de folhas frescas a ovinos através de cânula ruminal. O experimento foi dividido em quatro etapas, de acordo com a época de coleta da planta que foi administrada até que os animais apresentassem sinais clínicos de intoxicação ou seu término. Alíquotas das folhas fornecidas aos ovinos foram enviadas para dosagem de monofluoracetato. Todos os estágios vegetativos da planta foram tóxicos durante o experimento, entretanto as maiores concentrações de monofluoracetato foram detectados em sementes e brotos. Folhas maduras (colhidas em agosto e dezembro) e velhas (colhidas em dezembro) também causaram intoxicação fatal. Esses resultados demonstram que *A. pubiflora* pode ser tóxica mesmo quando as concentrações de MFA são baixas, evidenciando que a simples presença desta substância é um fator de risco para a ocorrência da intoxicação. O conhecimento das variações de concentração do princípio tóxico nos permite determinar a patogenia das intoxicações, assim como estimar as condições de ocorrência, possíveis tratamentos, controle e profilaxia, contribuindo para a diminuição de perdas econômicas a campo devido às intoxicações por essas plantas. Para testar a suscetibilidade de ovinos a *V. rubricaulis* e estabelecer os sinais clínicos, achados laboratoriais e patológicos, oito ovinos foram alimentados com doses variadas da planta. O início dos sinais clínicos ocorreu entre 6 e 48 horas após a administração de *V. rubricaulis* e os cursos clínicos duraram de 6 a 56 horas após a ingestão. As atividades séricas de aspartato aminotransferase, gama-glutamil transferase e fosfatase alcalina foram elevadas e os níveis sanguíneos de glicose diminuíram nos ovinos acometidos. Os sinais clínicos consistiam em apatia, anorexia, focinho seco, desconforto respiratório, dor abdominal e fezes pastosas com estrias de sangue e muco. Dois ovinos tinham sinais neurológicos, incluindo fasciculação muscular, nistagmo, movimentos de remo e cegueira. Necrose hepática foi detectada antes da morte por meio de biópsia. Cinco animais morreram

e três se recuperaram. O fígado foi acometido em todos os ovinos necropsiados: aumento de volume e acentuação do padrão lobular com áreas vermelhas deprimidas intercaladas com uma rede amarelo pálida. Ascite e hidropericárdio foram achados consistentes. Microscopicamente necrose coagulativa centrolobular a massiva foi observada. Necrose coagulativa também foi observada em alguns túbulos renais proximais. Lesões microscópicas não foram encontradas em nenhum outro órgão. A gravidade das lesões hepáticas foi proporcional ao tamanho da dose. A análise química do carboxiatractilosídeo no material vegetal de *V. rubricaulis* apresentou resultado negativo. Conclui-se que o envenenamento por *V. rubricaulis* em ovinos possui característica clínica, bioquímica e patológica de uma hepatotoxicose aguda.

**Palavras-Chave:** *Amorimia pubiflora*, Hepatotoxicidade, Monofluoroacetato, Plantas tóxicas, *Vernonia rubricaulis*

## ABSTRACT

**GODOY, K.C.S. Experimental model for validation of indicators of acute and chronic cardiotoxic injury in sheep. 2018. 52p. Doctoral Thesis - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil, 2018.**

The consumption of toxic plants is one of the main causes of economic losses for Brazilian livestock, due to losses in productivity, reduction of reproductive rates or death of animals. Among these, *Amorimia pubiflora*, which contains monofluoroacetate as a toxic principle, stands out as the cardiotoxic plant, which causes sudden death, which is more important for the cattle raising of Mato Grosso do Sul, accompanied by the hepatotoxic plant *Vernonia rubricaulis*. Toxic plants containing monofluoroacetate cause sudden death in production animals causing economic losses to producers. Research on control methods for this plant toxicosis is actively being developed. A possible method of control is the identification and selection of animals relatively resistant to the effects of MFA through clinical pathology tests. The objectives of this work were to develop an experimental model to identify sheep resistant to MFA by given them increasing non-lethal doses of MFA while detecting possible affected sheep through the determination of the following analytes, MB fraction of creatine kinase (CK-MB), aspartate aminotransferase (AST), blood ionized calcium (BIC), and blood glucose (BG). Five sheep (Group 1) received increasing intraruminal doses of MFA diluted in water for six periods of 3-5 days with an interval of 10 days between each period. Five control sheep (Group 2) received 10ml of intraruminal deionized water following identical periods of feeding and intervals between feedings as sheep from Group 1. Blood was sampled from each sheep in the first day of the experiment, immediately before the MFA or deionized water was administered, and then 48 and 120 hours after the first sampling for determination of serum levels of CK-MB, AST, BIC, and BG. The average values for all sheep for each of the analytes were compared between treated and control groups using the Mann-Whitney non-parametric test with a confidence interval of 5%. Clinical signs when observed included anorexia, apathy, reluctance to move, incoordination, muscle tremors, spreading of hind limbs, and sternal decubitus. Sheep that died were necropsied. No gross lesions were found in the heart. Microscopically lesions in the myocardium were foci of acute necrosis of cardiomyocytes. Sheep did not develop resistance to MFA after several non-lethal doses and there were no significant differences in the levels of CK-MB, AST, BIC, and BG between groups. The detection of subclinically affected sheep by the analytes used in the current experiment proved unfeasible. Crescent non-lethal doses of MFA, as those used in this experiment, allow the identification of toxic dose for each sheep as variations in individual susceptibility. This study aimed to determine the amount of MFA present in seedlings, mature leaves, old leaves, and seeds of *Amorimia pubiflora* harvested at different times of the year and its toxic effect on sheep. Samples of *Amorimia pubiflora* were collected during the months of April, August and December of 2015 and March of 2016, separated according to the vegetative stage (seedlings, seeds, mature leaves, and old leaves), dried in a drying oven, and administered in daily doses equivalent to 5 g / kg of fresh leaves to sheep through ruminal cannula. The experiment was divided into four stages according to the time of collection of the plant so that in each of them a sheep received a different vegetative stage of the plant (seedlings, mature leaves, and old leaves). Only in the second stage of the experiment it was possible to collect *A. pubiflora* seeds and these were administered to one sheep using the same method used for the administration of the leaves. The plant was administered until the animals showed clinical signs of toxicosis or until the plant was not available anymore. Aliquots of leaves and seeds of *A. pubiflora* dosed to sheep were submitted for dosing of monofluoroacetate in a toxicology laboratory. All vegetative stages

of the plant were toxic during the experiment, but higher levels of monofluoroacetate were detected in seeds and seedlings. Mature leaves (collected in August and December) and old leaves (collected in December) also caused fatal poisoning. The results of our study show that *A. pubiflora* is toxic to sheep even when MFA concentrations are low, demonstrating the presence of this substance is a risk factor for the occurrence of poisoning. Knowing the toxic principle and its variations allows us to determine the pathogenesis of plant toxicosis as well as the conditions of occurrence, possible treatments, control, and prophylaxis, contributing significantly to the reduction of economic losses in farms due to plant poisoning. In order to evaluate the susceptibility of sheep to *V. rubricaulis* and to establish the clinical signs, serum biochemistry, and pathological findings, eight sheep were fed varying doses of *V. rubricaulis*. The onset of clinical signs occurred 6e48 h after the ingestion of *V. rubricaulis*. Clinical courses lasted 6e56 h after the ingestion of the plant. Serum activities of aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transferase, and alkaline phosphatase were highly elevated and glucose blood levels were low in affected sheep. Clinical signs consisted of apathy, anorexia, dry muzzle, respiratory distress, abdominal pain, and mushy feces with streaks of blood and mucus. Two sheep had neurological signs including muscle fasciculation, nystagmus, paddling movements, and blindness. Liver necrosis could be detected antemortem through liver biopsy. Five sheep died and three recovered. The liver was affected in all necropsied sheep; it increased in volume and had marked accentuation of the lobular pattern with red, depressed areas intercalated with a pale yellow network. Ascites and hydropericardium were consistent findings. Microscopically, centrilobular to massive coagulative necrosis was observed. Coagulative necrosis was also observed in a few proximal renal tubules. Microscopic lesions were not found in any other organs. The severity of liver lesions was proportional to the dose. Chemical analysis to detect carboxyatractyloside in *V. rubricaulis* plant material was negative. It is concluded that *V. rubricaulis* poisoning in sheep is clinically, biochemically, and pathologically characteristic of an acute hepatotoxicosis.

**Keywords:** *Amorimia pubiflora*, Hepatotoxicity, Monofluoroacetate, Toxic plants, *Vernonia rubricaulis*



---

## SUMÁRIO

---

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. CAPÍTULO 1.....</b>                                                                                        | <b>10</b> |
| <b>1.1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                       | <b>10</b> |
| <b>1.2 REVISÃO DE LITERATURA:.....</b>                                                                           | <b>12</b> |
| 1.2.1 Plantas cardiotoxícas e Indicadores de injúria cardíaca.....                                               | 13        |
| 1.2.1.1 Planta cardiotoxíca: <i>Amorimia pubiflora</i> .....                                                     | 13        |
| 1.2.1.2 Biomarcadores de injúria cardíaca .....                                                                  | 16        |
| 1.2.2. Intoxicação por planta hepatotóxica: <i>Vernonia rubricaulis</i> .....                                    | 17        |
| 1.2.2.1 Biomarcadores de injúria hepática.....                                                                   | 19        |
| 1.3.3 Intoxicação experimental.....                                                                              | 20        |
| <b>2. Modelo experimental para avaliação da resistência à intoxicação por monofluoracetato em ovinos.....</b>    | <b>36</b> |
| Resumo.....                                                                                                      | 36        |
| Introdução.....                                                                                                  | 37        |
| Materiais e Métodos.....                                                                                         | 38        |
| Resultados.....                                                                                                  | 39        |
| Discussão .....                                                                                                  | 39        |
| Referências.....                                                                                                 | 41        |
| <b>3. Capítulo 2: Toxicidade dos diferentes estágios vegetativos de <i>Amorimia pubiflora</i> em ovinos.....</b> | <b>44</b> |
| Resumo.....                                                                                                      | 44        |
| Introdução.....                                                                                                  | 45        |
| Materiais e Métodos.....                                                                                         | 47        |
| Resultados.....                                                                                                  | 49        |
| Discussão .....                                                                                                  | 50        |
| Referências.....                                                                                                 | 52        |
| <b>4. Capítulo 4: Intoxicação experimental por <i>Vernonia rubricaulis</i> em ovinos.....</b>                    | <b>54</b> |
| Resumo.....                                                                                                      | 55        |
| Introdução.....                                                                                                  | 55        |
| Materiais e Métodos.....                                                                                         | 56        |
| Resultados .....                                                                                                 | 59        |
| Discussão.....                                                                                                   | 62        |
| Referências.....                                                                                                 | 65        |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                                              | <b>68</b> |
| Artigo publicado.....                                                                                            | 68        |
| Autorizações Legais.....                                                                                         | 69        |

## 1. CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, morrem, anualmente, milhões de bovinos em consequência da ingestão de plantas tóxicas, que é facilitada, principalmente, pelo sistema de alimentação da pecuária nacional, baseada no consumo de pastagens nativas ou plantadas que acabam expondo os animais a essas plantas, gerando importante prejuízo econômico (Riet-Correa; Medeiros, 2001, Tokarnia et al., 2012).

Considerando essa singularidade regional, o desenvolvimento de pesquisas que pretendem caracterizar o quadro clínico-patológico e epidemiológico de intoxicações fitógenas para o aperfeiçoamento de técnicas de prevenção a surtos de intoxicações tem aumentado, inclusive resultando no acréscimo da identificação de plantas tóxicas para ruminantes e equinos nas últimas décadas. Em 1990, contavam-se 60 espécies tóxicas, em 2012, ampliou-se para 131 espécies e 79 gêneros (Pessoa et al., 2013).

Dentre essas, destacam-se as plantas causadoras de “morte súbita”, cuja toxicose se caracteriza por evolução superaguda com quadro de insuficiência cardíaca (Tokarnia et al., 2012; Pessoa et al., 2013). Convém salientar a toxicidade da *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae), a mais importante planta cardiotoxica de interesse pecuário para Mato Grosso do Sul, responsável por cerca de 11,54% das mortes de bovinos por intoxicação fitógena no período de 2008 a 2012 no estado (Souza et al., 2015).

Integrante da família Malpighiaceae, a *Amorimia pubiflora* possui o ácido monofluoroacético de sódio (MFAS) como princípio tóxico, em vista disso, sua toxicose é resultante da ação do seu metabólito ativo, o fluorocitrato, por meio da “síntese letal”, que interrompe o ciclo e produção de adenosina trifosfato (ATP), prejudicando órgãos com maiores taxas metabólicas, como o coração (Krebs et al., 1994; Santos et al., 2014).

Os quadros clínico-patológicos desencadeados pela planta e pela ação direta do ácido monofluoroacetato se assemelham. Os sinais clínicos são compatíveis com quadro de insuficiência cardíaca aguda ou superaguda com morte súbita, sem alterações morfológicas evidentes (Tokarnia et al., 2012; Santos et al., 2014). Quanto às alterações histopatológicas, geralmente, incluem necrose de coagulação de fibras musculares do miocárdio e vacuolização intracitoplasmática (Soares et al., 2011;

Santos et al., 2014). As severidades dessas lesões foram ratificadas por imuno-histoquímica anti-troponina C, proteína estrutural celular, em bovinos (Pavarini et al., 2012; Bandinelli et al., 2014).

As intoxicações por plantas cardiotoxícas também podem cursar com insuficiência cardíaca crônica, associada a lesões degenerativas e fibrosantes no miocárdio, como a toxicose decorrente do consumo da *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae), que ainda não possui o princípio tóxico identificado, contudo os sinais clínicos decorrentes da ingestão dessa planta são compatíveis com insuficiência miocárdica que leva a formação de edema subcutâneo e jugulares ingurgitadas (Carvalho et al., 2006). Na necropsia, observam-se áreas claras no epicárdio, hipertrofia concêntrica e feixes esbranquiçados no miocárdio. Na avaliação histopatológica, nota-se vacuolização de fibras isoladas, tumefação difusa de fibras miocárdicas, fibrose intersticial e necrose massiva de fibras cardíacas (Tokarnia et al., 2012).

Apesar dos danos cardíacos para estas intoxicações terem sido identificados, após necropsia, a caracterização clínico-laboratorial *ante-mortem* da cardiopatia não foi demonstrada. Dessa forma este estudo procurou estabelecer um modelo experimental para avaliação de cardiomarcadores séricos, com intuito de colaborar com informações relacionadas ao comportamento do princípio tóxico no organismo animal. Esses biomarcadores são substâncias de fácil aplicabilidade liberadas para circulação a partir da injúria celular. Considerando que ainda não foram desenvolvidos marcadores cardíacos para animais de produção, uma alternativa para as dosagens é a utilização de *kits* diagnósticos humanos.

Nesse mesmo sentido, paralelamente aos estudos de cardiomarcadores, realizou-se um experimento com biomarcadores de injúria hepática no intuito de verificar se os hepatomarcadores desenvolvidos para humanos podem ser empregados em estudos de intoxicações em animais. Com esta finalidade, reproduziu-se a intoxicação por *Vernonia rubricaulis* em ovinos, dado que estudos anteriores com plantas desse gênero descreveram lesões hepáticas nesta espécie animal (Dutra et al., 2016).

A *Vernonia rubricaulis* é a planta hepatotóxica de interesse pecuário mais importante para o estado de Mato Grosso do Sul, responsável por 25% dos surtos diagnosticados no período de 2008-2012, possui alta letalidade e princípio tóxico

desconhecido (Souza et al., 2015). O quadro clínico-patológico desencadeado por essa planta tóxica é compatível com insuficiência hepática aguda, com evolução grave e rápida após consumida. Alterações patológicas incluem necrose hepática massiva, ressecamento do conteúdo intestinal e edema da parede da vesícula biliar (Purisco; Lemos, 2008). Histologicamente, severa necrose de coagulação e hemorragias (Brum et al., 2002; Purisco; Lemos, 2008). Apesar das lesões em hepatócitos e hemorragias terem sido identificadas pós- morte, não se encontram relatos de experimentos que empregam hepatomarcadores séricos na investigação dessas injúrias.

## 1.2. REVISÃO DE LITERATURA

O consumo de plantas tóxicas é uma das principais causas de prejuízos econômicos para a pecuária brasileira, por perdas da produtividade, redução dos índices reprodutivos ou morte dos animais, além de gastos para controle das plantas tóxicas nas pastagens, com medidas de manejo e diagnóstico para evitar novas intoxicações, e aquisição de novos animais para substituição (Riet-Correa; Medeiros, 2001; Tokarnia et al., 2012).

As plantas tóxicas são classificadas, em função do quadro clínico-patológico que promovem nos animais (Tokarnia et al., 2000) por isso caracterizar os efeitos e a epidemiologia das intoxicações fitógenas favorece o aperfeiçoamento de técnicas de prevenção a surtos importantes para pecuária nacional.

Estudo realizado por Souza et al. (2015) no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de 2008-2012, estimou que 5,68% das mortes dos bovinos no estado foram causadas por intoxicação fitógena. Nesse estudo foram descritas as principais plantas tóxicas associadas a essas mortes: *Brachiaria* spp. (27,88%), *Vernonia rubricaulis* (25%), *Amorimia pubiflora* (11,54%), *Senna occidentalis* e *S. obtusifolia* (8,65%), *Enterolobium contortisiliquum* e polpa cítrica (3,85% cada), *Stylosanthes* spp. (2,88%), *Tetrapteryx multiglandulosa* (1,92%), *Manihot* spp., *Simarouba versicolor*, *Crotalaria* spp., *Pterodon emarginatus* e *Solanum malacoxylon* (0,96% cada).

Dentre essas, a *Amorimia pubiflora* destaca-se como a planta cardiotoxica, causadora de morte súbita, mais importante para a pecuária do Mato Grosso do Sul (Tokarnia et al., 2012; Pessoa et al., 2013) acompanhada de plantas hepatotóxicas como a *Vernonia rubricaulis* e *Brachiaria* spp. (Souza et al., 2015). Contudo, ao se

analisar os coeficientes de morbidade e letalidade dos surtos e a área plantada, conclui-se que a importância da *Brachiaria* spp. como planta tóxica é pequena quando comparada ao seu potencial como forrageira e desta forma, a *Vernonia rubricaulis* pode ser considerada como a planta tóxica de interesse pecuário mais importante em Mato Grosso do Sul (Lemos et al., 2009).

### 1.2.1 Plantas cardiotoxícas e Indicadores de injúria cardíaca

#### 1.2.1.1 Planta cardiotoxíca: *Amorimia pubiflora*

A *Amorimia pubiflora*, é uma planta com efeitos cardiotoxícos que acarreta quadro de insuficiência cardíaca aguda. Apontada como terceira planta tóxica que mais causa morte no rebanho bovino de Mato Grosso do Sul, está entre as 12 plantas causadoras de morte súbita descritas como responsáveis pela morte de 500.000 bovinos anualmente no país (Tokarnia et al., 2012; Souza et al., 2015).

Popularmente conhecida por corona, cipó prata ou erva-corona, a *Amorimia pubiflora* é um arbusto escandente da família Malpighiaceae, presente nos municípios de Miranda, Porto Murtinho, Jardim, Bonito, Aquidauana, Três Lagoas e Paranaíba, além de regiões adjacentes ao estado de Mato Grosso do Sul como o sul do estado de Goiás e municípios da região Sudeste. Habita comumente pastos recém-formados com solos ricos em matéria orgânica, é de difícil erradicação devido ao sistema radicular bem desenvolvido e com intensa rebrota após aplicação de medidas como uso de herbicidas ou arranque manual (Purisco; Lemos, 1998; Tokarnia et al., 2012; Becker et al., 2013).

Experimentalmente, observou-se que a fase de brotação da *A. pubiflora*, coincide com o período da seca e escassez da pastagem, é o período vegetativo de maior toxidez da planta que sofre variação com a época do ano oscilando entre 5g/kg à 20g/kg na seca e no período chuvoso, respectivamente (Tokarnia et al., 2012; Becker et al., 2013). No entanto os autores mencionam que a intoxicação pode ocorrer independente da fase vegetativa.

Estudo realizado por Lee et al. (2012) identificou o ácido monofluoroacético de sódio (MFAS), substância extremamente tóxica para diversas espécies, como princípio tóxico da *Amorimia pubiflora*, e também encontrado em outras plantas

causadoras de morte súbita como a *Palicourea marcgravii* (Lee et al., 2012; Tokarnia et al., 2012).

A intoxicação por esta substância é resultante da ação do fluorocitrato, metabólito ativo do MFAS, formado no organismo por meio da denominada “síntese letal”, que ocorre quando o monofluoroacetato de sódio é incorporado à acetilcoenzima A, formando a fluoroacetil coenzima A que se conjuga ao oxaloacetato no ciclo de Krebs, compondo o fluorocitrato, que age competitivamente, bloqueando a ação da aconitase. Com o bloqueio desta enzima no ciclo de Krebs, não ocorre a conversão de citrato em isocitrato, o que interrompe o ciclo e produção de ATP. O citrato é acumulado em vários tecidos e os processos metabólicos dependentes de energia são bloqueados prejudicando principalmente os órgãos que apresentam maiores taxas metabólicas como coração, fígado e rins, provocando a morte súbita dos animais intoxicados (Peters et al., 1952; Krebs et al., 1994; Santos et al., 2014).

As alterações clínico-patológica se intensificam quando os animais são submetidos ao exercício físico que leva ao aumento da necessidade energética e evolução superaguda ou aguda, de até 48h, dos sinais clínicos com morte súbita (Pavarini et al., 2011; Tokarnia et al., 2012; Duarte et al., 2013).

Em ruminantes são observados, principalmente, dispneia, cianose, convulsões, relutância em se levantar, andar rígido, pouco tempo em posição quadrupedal com evolução súbita para decúbito lateral, movimentos de pedalagem e morte (Becker et al., 2013). Nos achados patológicos não se observam alterações macroscópicas significativas, com escassos relatos de edema pulmonar, hidropericárdio, hemorragias no epicárdio, endocárdio e palidez miocárdica (Pavarini et al., 2011; Santos et al., 2014).

Em ovinos, caprinos e bovinos intoxicados pelo monofluoroacetato foram identificados, microscopicamente, necrose de coagulação de fibras musculares miocárdicas individuais, vacuolização intracitoplasmática (Pavarini et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Santos et al., 2014) e áreas de fibrose no músculo cardíaco (Soares et al., 2011). O exame imuno-histoquímico foi usado para determinar a extensão dessas lesões cardíacas. A ausência de marcação citoplasmática dos cardiomiócitos com anticorpo humano anti-troponina C (cTnC), demonstrou alta sensibilidade como marcador tecidual de lesão em bovinos (Bandinelli et al., 2014).

Apesar disso não se encontram relatos de experimentos que apliquem uma metodologia de investigação destas injúrias por meio do uso de biomarcadores séricos específicos como a troponina I cardíaca (cTnI), importante marcador de lesão miocárdica, considerado teste de eleição em lesões miocárdicas em humanos e validado para identificação de lesões cardíacas isquêmicas em ovinos (Leonardi et al., 2008) e bovinos (Varga et al., 2009) e a dosagem do peptídeo natriurético NT-ProBNP, marcador de hipertrofia ventricular e insuficiência cardíaca congestiva, já utilizado experimentalmente em ovinos com sobrecarga cardíaca induzida por ligação da artéria Aorta (Pemberton et al., 1998).

O uso de métodos de diagnóstico não invasivo, poderiam auxiliar na identificação e controle da intoxicação pelo monofluoroacetato evitando a morte dos animais e diminuindo os prejuízos gerados na pecuária brasileira. Uma vez que os métodos utilizados para erradicação de plantas que possuem monofluoroacetato se mostram ineficazes e sua presença nas pastagens é suficiente para causar quadros de intoxicação devido ao consumo em qualquer época do ano, pesquisas envolvendo a indução de resistência em animais que consomem plantas com este princípio tóxico estão em desenvolvimento, (Tokarnia et al., 2012; Becker et al., 2013).

Pesquisadores observaram que os animais se tornavam resistentes as intoxicações quando doses não tóxicas de plantas que continham o monofluoroacetato foram administradas oralmente (Duarte et al., 2013; Oliveira et al., 2013). Contudo a administração em ovinos do ácido monofluoroacetato em doses não letais não aumentou esta proteção (Santos et al., 2014). Apesar da ocorrência de resistência individual a intoxicação experimental com monofluoroacetato em ovinos ter sido observada nesse estudo.

A inoculação ruminal de bactérias que degradam o monofluoroacetato de sódio mostrou-se capaz de induzir resistência ao agente intoxicante, entretanto ainda não se sabe a duração dessa defesa (Pessoa et al., 2015). No entanto deve ser considerado as dificuldades do emprego destas medidas na rotina prática da pecuária, além dos riscos de administração de doses não tóxicas de plantas com monofluoroacetato, pois apresentam grande variação de toxidez.

Dessa forma uma alternativa promissora para o controle das intoxicações é a identificação de animais resistentes, no entanto é necessário o desenvolvimento de uma metodologia que possibilite a identificação desses animais. Uma possibilidade é

a avaliação da elevação de marcadores de lesão cardíaca a níveis acima dos parâmetros fisiológicos considerados normais para a espécie, em animais que recebem dose não letais de plantas cardiotoxícas. Morris et al. (1995) descrevem que Nova Zelândia, foi realizado um estudo com a enzima hepática gama glutamil transferase (GGT), que permitiu selecionar rebanhos resistentes ao eczema facial, por meio do monitoramento enzimático deste marcador bioquímico de lesão hepática (Morris et al., 1995).

#### 1.2.1.2 Biomarcadores de injúria cardíaca

Os marcadores bioquímicos séricos são substâncias liberadas para circulação a partir de lesão celular e podem auxiliar no entendimento dos efeitos tóxicos desencadeados por plantas de interesse pecuário. A aspartato-transaminase (AST), a creatina quinase (CK) fração MB (CK-MB) (Melo et al., 2008) e a Troponina I Cardíaca (cTnI) são os principais biomarcadores de lesão em cardiomiócitos e apresentam alterações nos valores séricos em cardiopatias agudas (Tunca et al., 2008; Neuwald et al., 2013). A AST foi o primeiro biomarcador sérico de lesão cardíaca utilizado em humanos, mas mostrou-se de baixa especificidade e vem sendo substituído. Na medicina veterinária, a despeito do desconhecimento da eficiência da enzima para a marcação de lesão em cardiomiócitos, ainda tem sido adotada em associação com outros analitos (Neuwald et al., 2013)

Quando ocorre necrose no miocárdio, há liberação da isoenzima CK-MB para o meio extracelular, e a determinação de sua atividade sérica é considerada um importante recurso para a detecção de lesão cardíaca, especialmente em humanos (Diniz et al., 2007). Em animais é considerada menos específica, ainda assim, é usada para acompanhamento de cardiopatias (Fredericks et al., 2001, Pedroso et al., 2009). Em intoxicação experimental com *Nerium oleander* reproduzida em bovinos, Pedroso et al. (2009) observaram uma correlação entre aumento da atividade sérica da enzima e a quantidade de planta administrada.

A troponina cardíaca (cTnI) é uma proteína que inibe a interação entre a actina e a miosina, até a entrada do cálcio no interior das células miocárdicas normais. É considerada um marcador de injúria miocárdica de alta sensibilidade e especificidade quando aumentada no soro sanguíneo, uma vez que lesão sarcomérica dos



cardiomiócitos provocam sua liberação para a circulação (Smith et al., 1997). A efetividade desse biomarcador já foi estabelecida em diversas espécies, entre elas, ovinos com doença do músculo branco, Tetralogia de fallot (Gunes et al., 2010; Neuwald et al., 2013) e bovinos (Tunca et al., 2008).

#### 1.2.2. Intoxicação por planta hepatotóxica: *Vernonia rubricaulis*

Embora, no Brasil, o mais importante grupo de plantas tóxicas seja o de plantas causadoras de “morte súbita” motivador de, aproximadamente, 50% das mortes de ruminantes por essa toxicose em Mato Grosso do Sul observa-se o predomínio de surtos consequentes da ingestão de plantas hepatotóxicas (Souza et al., 2015). Essas plantas constituem um grupo com aproximadamente 35 espécies, distribuídas em 16 gêneros e divididas em três grupos: plantas que causam necrose hepática aguda; as que causam fibrose hepática e as plantas que causam fotossensibilização (Santos et al., 2008).

Entre as causadoras de necrose hepática e agente de elevada mortandade de bovinos está a *Vernonia rubricaulis*, um subarbusto da família Asteraceae, encontrada nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul em áreas sujeitas à inundação temporária, em regiões de água salobra ou em solos argilosos, principalmente, pantanal (Purisco ; Lemos, 2008; Tokarnia et al., 2012). A adaptação dessa planta aos solos arenosos e períodos de baixo índice pluviométrico é proporcionada pela presença de xilopódio ou rizóforo, estrutura que armazena a água facilitando sua rebrota.

Os surtos de intoxicação por *V. rubricaulis* estão relacionados a fatores que estimulam o consumo e/ou a brotação da planta, considerada a fase vegetativa mais tóxica, como a utilização de roçadeiras e queimadas, a introdução de animais em pastagem seca com presença da planta ou de animais em situações de fome e sede, quando transportados ou mantidos em curral por longos períodos, ou colocados em áreas superlotadas (Tokarnia; Döbereiner, 1982; Brum et al., 2002).

A intoxicação espontânea por *Vernonia rubricaulis* em bovinos do Pantanal do Mato Grosso do Sul foi descrita pela primeira vez por Tokarnia e Döbereiner (1982) e novos surtos envolvendo a morte de 954 bovinos foram identificados na região no período de 1999 a 2001 (Brum et al., 2002). De 2008-2012 a *V. rubricaulis* foi

responsabilizada por 25% das mortes de bovinos decorrentes de intoxicação fitógena no Estado de Mato Grosso do Sul (Souza et al., 2015).

Na região Pantaneira do Estado, que concentra o segundo maior rebanho bovino do país, já foram identificados surtos por *V. rubricaulis* nos municípios de Corumbá, Miranda e Porto Murtinho, (PPM, 2014; Brum et al., 2002; Souza et al., 2015). Em virtude disso, é indispensável o conhecimento das condições que possam gerar perdas econômicas para a pecuária local. Dessa forma a realização do diagnóstico preciso do processo tóxico baseado em dados epidemiológicos e patológicos poderão facilitar a diferenciação da intoxicação causada por outras plantas hepatotóxicas.

A intoxicação por *V. rubricaulis* provoca apatia, tremores, desidratação, fezes ressecadas com estrias de sangue, agressividade, incoordenação, retração de abdômen e salivação (Brum et al., 2002; Purisco; Lemos, 2008) e achados de necropsia e lesões histológicas com evolução de 12 a 48 horas (Brum et al., 2002). Nos achados patológicos são descritas alterações hepáticas significativas como a necrose hepática massiva, reconhecida por extensas áreas amareladas intercaladas com áreas avermelhadas no fígado (Brum et al., 2002), ressecamento do conteúdo do omaso, ceco, cólon e edema da parede da vesícula biliar (Purisco; Lemos, 2008).

Microscopicamente, severa necrose de coagulação, predominante na região centrolobular, vacuolização de hepatócitos e hemorragias demonstram o envolvimento de perturbação da circulação hepática na progressão da doença (Brum et al., 2002; Purisco; Lemos, 2008; Tokarnia et al., 2012). Essas alterações são semelhantes às descritas nas intoxicações por outras plantas hepatotóxicas tais quais *Vernonia molíssima* (Gava et al., 1987) e *Cestrum laevigatum* (Purisco; Lemos, 1998), entretanto não está esclarecido se a lesão é induzida diretamente pelo princípio tóxico ou por seus metabólitos.

Apesar desse conhecimento não se encontram relatos de experimentos que aplicaram metodologia baseada no monitoramento destas injúrias a partir de marcadores de injúria hepática séricos, não invasivos, liberados para circulação sanguínea a partir do dano celular. Desse modo o entendimento do quadro clínico patológico desenvolvido na intoxicação por *V. rubricaulis* por meio da avaliação do comportamento de hepatomarcadores constitui uma importante ferramenta

diagnóstica que pode auxiliar juntamente com o histórico, presença da planta e dados de histopatologia.

#### 1.2.2.1 Marcadores de injúrias hepáticas

Dentre os hepatomarcadores destacam-se os indicadores de colestase ou lesão de ductos biliares: gama-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA); as enzimas que refletem a lesão de membrana ou necrose de hepatócitos: aspartato-amino transferase (AST), e de síntese hepática: colesterol e glicose importantes parâmetros avaliados em quadros de hepatopatias (Santos et al., 2008; Stockham; Scott, 2011).

A GGT, associada a membranas celulares, é capaz de catalisar a transferência de grupos glutamyl entre peptídeos e está envolvida nas reações de glutathione. O aumento da atividade sérica desta enzima indica colestase ou hiperplasia biliar. A colestase estimula a produção e liberação de GGT e Fosfatase Alcalina (FA). Em bovinos, em geral, considerase que atividade de GGT tem maior sensibilidade para determinar distúrbios biliares do que a FA. Distúrbios associados à atividade aumentada de GGT incluem obstrução do ducto biliar, colangite, colecistite, processos tóxicos, intoxicação por plantas, intoxicação por cobre, micotoxicose e faciolose (Kaneko et al., 2008; Stockham; Scott, 2011).

A AST é uma enzima citoplasmática e mitocondrial que catalisa uma ligação reversível envolvida na disseminação de aspartato para transformar oxalacetato a ser utilizado no ciclo de Krebs. O aumento no AST pode indicar dano reversível ou irreversível ao hepatócito em reação a uma variedade de lesões que incluem inflamação, traumatismo, hipóxia ou em processo regenerativo de doença hepática. Em bovinos e equinos, a AST comumente aumenta em função de lesão hepatocelular (Kaneko et al., 2008; Stockham ; Scott, 2011).

O fígado é um órgão essencial na manutenção da glicemia, pois os hepatócitos têm a função de converter os produtos originários da digestão e metabolização tecidual endógena (glicólise a partir de aminoácidos e glicerol) em glicose, além de transformá-la em glicogênio e regular o nível glicêmico sanguíneo (Stockham; Scott, 2011).

Destarte estes biomarcadores de danos hepáticos, considerados importantes métodos de diagnóstico não invasivo, poderão auxiliar na determinação do quadro patológico da intoxicação. Cabe reforçar que a injúria hepatocelular ocorre de forma aguda e grave desencadeando perda de massa de células hepáticas e alta taxa de mortalidade para os animais que ingerem *Vernonia rubricaulis* (Brum et al., 2002).

Dessa forma ressaltando se a aplicabilidade dos biomarcadores, substâncias liberadas para circulação a partir de injúria celular nos quadros de intoxicações. Considerando que ainda não foram desenvolvidos marcadores cardíacos para animais de produção, uma alternativa para as dosagens é a utilização de *kits* diagnósticos humanos. Nesse sentido, desenvolveu-se um experimento com biomarcadores de injúria hepática com intuito de verificar se os hepatomarcadores desenvolvidos para humanos podem ser empregados em estudos de intoxicações em animais. Para esta finalidade, reproduziu-se a intoxicação por *Vernonia rubricaulis* em ovinos, dado que estudos anteriores com plantas desse gênero descreveram lesões hepáticas nesta espécie animal (Dutra et al., 2016).

### 1.2.3 Intoxicação experimental

Para confirmação de uma planta como fonte de intoxicação em animais, deve ser realizada a comprovação experimental, na espécie primeiramente afetada (Tokarnia et al., 2012). Por esse motivo, intoxicações foram reproduzidas, experimentalmente, em bovinos com plantas das espécies *A. exotropica* (Gava et al. 1998) e *A. publifora* (Becker et al., 2013), *V. rubricaulis*, *V. monocephala*, *V. natalensis* e *V. squarrosa* (Tokarnia; Döbereiner, 1982, 1983). Recentemente, Dutra et al. (2016) descreveram um surto espontâneo e a reprodução experimental da intoxicação em ovinos com *V. plantaginoides* (*squarrosa*) no Uruguai.

Ovinos são empregados como modelos experimentais para reprodução de Intoxicações por plantas que ocorrem, espontaneamente, em bovinos (Cardinal et al., 2010, Bacha et al., 2017) exibindo quadro clínico-patológico semelhantes. Além disso, a utilização dessa espécie oferece vantagens como a facilidade de manejo e a necessidade de menores investimentos com alimentos e infraestrutura (Stingger et al., 2001).

A reprodução da intoxicação com *A. pubiflora* e *V. rubricaulis* em ovinos poderá auxiliar no monitoramento do comportamento de exames complementares aplicados na investigação de injúria cardíaca e hepática e compreensão do quadro clínico-patológico, uma vez que essa espécie é sensível a intoxicação por outros gêneros dessas plantas (Gava et al., 1987; Zachary; McGavin, 2013; Dutra et al., 2016).

Importante mencionar que apesar dos danos cardíacos e hepáticos causados por plantas do gênero *Amorimia* e *Vernonia*, respectivamente terem sido determinados, após necropsia, a caracterização clínico-laboratorial *ante-mortem* dessas toxicoses não foram estabelecidas.

Assim, com intuito de colaborar com informações relacionadas ao comportamento dos princípios tóxicos dessas plantas no organismo animal, este estudo procurou estabelecer um modelo experimental para analisar o comportamento de biomarcadores séricos, na determinação precoce de lesões nos cardiomiócitos e hepatócitos.

### 1.3. Material e Métodos

Quatro experimentos foram executados para a elaboração deste trabalho:

Experimento 1 – Modelo experimental para avaliação da resistência à intoxicação por monofluoracetato em ovinos

Experimento 2- Avaliação da toxicidade dos diferentes estágios vegetativos das folhas de *Amorimia pubiflora* para os ovinos.

Experimento 3 - Modelo experimental para validação de indicadores de lesão cardiotoxica crônica em ovinos utilizando *Tetrapteryx multiglandulosa*.

Experimento 4- Intoxicação experimental por *Vernonia rubricaulis* em ovinos.

#### 1.3.1. EXPERIMENTO 1- Modelo experimental para avaliação da resistência à intoxicação por monofluoracetato em ovinos

##### **Material e métodos**

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS e protocolado sob o nº 706/2015. Foram utilizados 10 ovinos (oito

machos e duas fêmeas), previamente canulados, clinicamente sadios, sem raça definida, com 24 meses de idade e pesos entre 30-50 kg, sem contato prévio com qualquer fonte de MFA. Todos foram mantidos em baias individuais, alimentados com feno de Tifton (*Cynodon dactylon*), suplementação concentrada, sal mineral e água à vontade. A metodologia utilizada neste experimento foi adaptada de Santos et al. (2014). O Grupo 1 (G1) foi constituído por cinco ovinos (1, 2, 3, 4, 5) que receberam doses crescentes não letais de MFA (Sigma-AldrichCo.) diluído em 10 mL de água deionizada, através de cânula ruminal, por seis períodos: 0,05 mg/kg por 5 dias (período 1); 0,08 mg/kg por 4 dias (período 2); 0,08 mg/kg por 4 dias (período 3); 0,1 mg/kg por 3 dias (período 4); 0,1 mg/kg por 3 dias (período 5); 0,25 mg/kg por 3 dias (período 6). Entre cada período houve um intervalo de 10 dias sem a administração, visando minimizar o efeito acumulativo do MFA.

O Grupo 2 (G2) foi composto por outros cinco ovinos (6, 7, 8, 9, 10) que receberam apenas 10 mL de água deionizada, também através de cânula ruminal, nos mesmos períodos e respeitando os mesmos intervalos que os ovinos do G1.

Alíquotas de 5 ml de sangue foram obtidas por punção da veia jugular, acondicionadas em tubos sem anticoagulante até a formação de coágulo, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em tubo plástico tipo Eppendorf® a -80°C até o momento da avaliação. Estas coletas foram realizadas no primeiro dia de cada período (imediatamente antes do fornecimento das doses de MFA ou água deionizada) e 48 e 120 horas após a primeira coleta. Nos intervalos entre os períodos não foram colhidas amostras de sangue.

As dosagens das atividades séricas das enzimas creatina quinase fração MB (CK-MB) e aspartato transaminase (AST) foram utilizadas como indicadores de lesão cardíaca, enquanto os níveis de glicose e cálcio ionizado foram utilizados para detecção dos efeitos indiretos do MFA no organismo (hiperglicemia e hipocalcemia). Os ensaios bioquímicos, realizados por método enzimático, seguiram os protocolos disponibilizados nos kits comerciais (Roche®, Jaguaré, São Paulo, Brasil), com leitura em analisador bioquímico automático (cobas c 111).

No início de cada período era realizado exame físico para avaliação da frequência cardíaca, peso e comportamento. No dia seguinte ao fim de cada período, apenas frequência cardíaca e comportamento eram avaliados. Os animais eram

observados a cada seis horas e as observações intensificadas quando havia manifestação de sinais clínicos.

Como o objetivo do experimento foi apenas detectar diferenças na susceptibilidade entre os ovinos e identificar lesões cardíacas antes da apresentação dos sinais clínicos, e não necessariamente causar a morte, todos os ovinos que apresentaram sinais clínicos graves foram tratados com 2 g/kg de acetamida, diluída em água e administrada pela cânula ruminal. Quando os sinais clínicos eram brandos, os animais foram mantidos em repouso até total recuperação.

Nos casos com evolução fatal, realizou-se a necropsia com coleta de fragmentos dos diversos órgãos em formol tamponado 10%, que foram processados rotineiramente para exame histopatológico. O coração de cada animal foi seccionado transversalmente em cinco secções equidistantes (C1, C2, C3, C4 e C5) para avaliação do miocárdio e fragmentos de ventrículo esquerdo e direito, septo interventricular, músculo papilar direito e esquerdo foram coletados. Três corações de ovinos que não apresentavam necrose de cardiomiócitos, foram utilizados como controle negativo durante a avaliação histopatológica. Os níveis séricos das enzimas CK-MB e AST, assim como os níveis de glicose e cálcio ionizado foram comparados entre os grupos G1 e G2 através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, adotando-se o nível de significância de 5%.

### **Resultados e discussão:**

Descritos no artigo gerado pela pesquisa intitulado: Modelo experimental para avaliação da resistência à intoxicação por monofluoracetato em ovinos

#### **1.3.2. EXPERIMENTO 2 - Avaliação da toxicidade dos diferentes estágios vegetativos das folhas de *Amorimia pubiflora* para os ovinos.**

### **Material e métodos**

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS sob protocolo nº 537/2013. O experimento foi realizado em um período de 12 meses, dividido em quatro etapas que consistiram de: coleta, dessecação, administração da planta e envio de alíquotas para dosagem de monofluoracetato.

As amostras de *A. pubiflora* utilizadas no experimento foram colhidas em uma propriedade localizada no município de Miranda no estado de Mato Grosso do Sul (0° 24' 32.56"S, 56° 20' 31.85"O), onde surtos de intoxicação pela planta foram relatados pelo proprietário. Para padronizar as amostras colhidas, áreas com elevada densidade da planta dentro de um mesmo piquete foram cercadas com gaiolas teladas para evitar o acesso de bovinos. Posteriormente estas áreas foram roçadas e deixadas em repouso por um período de 60 dias objetivando a brotação da planta. Após este período, foram realizadas coletas sucessivas a cada quatro meses aproximadamente. As folhas eram classificadas em brotos (folhas verde claras, pequenas, macias, localizadas na porção mais apical da planta), folhas maduras (folhas verde claras, de tamanho médio, um pouco mais fibrosas que os brotos, localizadas na porção intermediária da planta) e folhas velhas (folhas verdes escuras, grandes, fibrosas, localizadas na porção basal da planta). Após, as coleta e classificação as amostras eram depositadas em sacos plásticos, acondicionadas em caixa de isopor com gelo reciclável e transportadas à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, onde passavam por dessecação em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Posteriormente, as folhas dessecadas eram trituradas em moinho com peneira de 2 mm e armazenadas em sacos plásticos vedados.

Para o cálculo da perda de água, 1 kg de folhas frescas de cada categoria era pesado após a dessecação e a porcentagem de redução do peso era usada no cálculo das doses a ser fornecidas aos ovinos. Alíquotas da planta dessecada foram enviadas ao Toxic Plant Laboratory, Agricultural Research Service, United States *Department of Agriculture*, Logan, UT, USA para dosagem do monofluoraraceto através do método HPLC–APCI–MS (Lee et al. 2012). O tempo entre a coleta das amostras e o envio para dosagem de MFA foi de dois meses para as do primeiro período, 14 meses para as do segundo, 8 meses para as do terceiro e 4 meses para as do quarto período. Já o tempo entre as coletas e o início dos experimentos variou de 14 a 35 dias.

Para o experimento foram utilizados 12 ovinos provenientes de áreas sem a ocorrência da intoxicação por plantas do gênero *Amorimia*, clinicamente saudáveis, sem raça definida, adultos e previamente vermifugados (Ripercol®). Os animais foram mantidos em baias individuais, teladas, de 2,0 m<sup>2</sup> e piso de chão, alimentados com ração comercial para a espécie (equivalente a 2% do PV), feno de tifton e água à vontade. Todos foram identificados por números sequenciais de 1 a 12 e submetidos



a exame físico antes da administração da planta e reexaminados na apresentação de sinais clínicos da intoxicação. Para avaliar a toxicidade, cada estágio vegetativo da planta dessecada foi fornecido a um ovino, em doses diárias equivalentes a 5 g/kg de folhas frescas, através de cânula ruminal. A administração da planta era interrompida se o animal apresentasse sinais clínicos de intoxicação ou ao término da planta.

Os efeitos cardiotóxicos foram avaliados por meio da determinação da atividade sérica das enzimas creatina quinase fração MB (CK-MB) e aspartato transaminase (AST). Os níveis de glicose e lactato séricos foram utilizados para detecção dos efeitos indiretos do MFA no organismo. Os ensaios bioquímicos seguiram os protocolos disponibilizados nos kits comerciais (Roche®, Jaguaré, São Paulo, Brasil), com leitura em analisador bioquímico automático (cobas c 111).

Nos casos com evolução fatal, realizou-se a necropsia com coleta e armazenamento de fragmentos dos diversos órgãos em formol tamponado 10%, que foram processados rotineiramente para exame histopatológico.

## **Resultados e discussão**

Os resultados dos marcadores bioquímicos obtidos compõem a Tabela 1. Ocorreu elevação nas atividades séricas de AST e CK-MB nos animais que morreram (1,7,9,10) e nos ovinos (2, 3 e 6) que não apresentaram sinais clínicos da intoxicação. O aumento dos níveis séricos de glicose e lactato ocorreu em todos os animais que morreram (6/12) e nos ovinos 4 ,2 e 6.

Os marcadores bioquímicos não se apresentaram consistentes e por isso foram desconsiderados.

Todos os estágios vegetativos da planta apresentaram toxicidade durante o período experimental, porém os brotos demonstraram ser mais tóxicos, a descrição da quantidade de MFA presente em brotos, folhas maduras, folhas velhas e sementes de *Amorimia pubiflora* colhidas em diferentes épocas do ano e seu efeito tóxico em ovinos consta no artigo gerado pela pesquisa: Toxicidade dos diferentes estágios vegetativos de *A. pubiflora* em ovinos.

Tabela 1. Dados bioquímicos obtidos dos ovinos intoxicados com *A. pubiflora* no momento anterior a administração da planta (M0) e na manifestação dos sinais clínicos ou ao término da planta (Mf).

| Ovino | CK-MB(UI/L) |       | AST (UI/L) |       | Glicose (mg/dL) |       | Lactato (mmol/L) |     |
|-------|-------------|-------|------------|-------|-----------------|-------|------------------|-----|
|       | M0          | Mf    | M0         | Mf    | M0              | Mf    | M0               | Mf  |
| 1*    | 203,3       | 227,7 | 63,3       | 77,6  | 86,4            | 280,4 | -                | -   |
| 2     | 101,2       | 224,5 | 55,0       | 55,1  | 55,9            | 74,18 | 1,0              | 6,4 |
| 3     | 116,3       | 154,7 | 64,6       | 91,5  | 54,7            | 296,6 | 1,4              | 3,5 |
| 4**   | 269,4       | 189,0 | 102,3      | 92,6  | 47,3            | 96,47 | 0,9              | 2,5 |
| 5*    | 166,7       | 142,9 | 47,4       | 53,8  | 46,5            | 152,9 | 1,3              | 7,7 |
| 6     | 318,2       | 350,7 | 134,8      | 165,7 | 62,7            | 88,3  | -                | -   |
| 7*    | 117,9       | 246,6 | 43,8       | 46,1  | 54,0            | 52,0  | 1,2              | 2,5 |
| 8*    | 192,2       | 180,0 | 97,1       | 106,4 | 60,0            | 140   | 1,0              | 4,7 |
| 9*    | 201,6       | 382,2 | 63,3       | 245,8 | 49,0            | 230,9 | 1,0              | 7,1 |
| 10*   | 141,9       | 161,0 | 54,9       | 95,7  | 54,0            | 217,0 | 1,1              | 9,0 |
| 11**  | 211,6       | 226,4 | 87,9       | 75,5  | 61,1            | 68,58 | -                | -   |
| 12    | 181,0       | 169,2 | 41,3       | 71,3  | 53,0            | 57,5  | 1,0              | 1,3 |

\* Ovino morreu; \*\* ovino: apenas apresentou sinais clínicos; AST: Aspartato Aminotransferase, CK-MB: creatina quinase fração MB

### 1.3.3. EXPERIMENTO 3- Modelo experimental para validação de indicadores de lesão cardiotóxicas crônica em ovinos utilizando *Tetrapteryx multiglandulosa*.

#### Material e métodos

O experimento foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentos (CEUA) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o protocolo CEUA-UFMS 707/2015.

Foram utilizados 4 ovinos, com 24 meses de idade e pesos entre 30 e 50 kg, previamente vermifugados, provenientes de áreas sem a ocorrência da intoxicação por plantas do gênero *Tetrapteryx*. Os animais foram mantidos em baias individuais de alvenaria com área de 2,0 m<sup>2</sup> e piso de cimento, alimentados ração comercial para a espécie (equivalente a 1% do PV), com feno de tifton e água à vontade. A cada ovino foi atribuído um número de identificação e foram submetidos a exame clínico completo antes da administração da planta.

Os animais receberam por via oral a dose equivalente a 20g/kg de pv de folhas frescas de brotos de *Tetrapteryx multiglandulosa* (folhas verde claras, pequenas, macias, localizadas na porção mais apical da planta) dessecadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Para o cálculo da perda de água, 1 kg de folhas frescas foi pesado após a dessecação e a porcentagem de redução do peso

utilizada no cálculo das doses administradas aos ovinos. A planta pertencia ao canteiro experimental de plantas tóxicas da UFMS.

Para investigação de danos cardíacos os animais foram submetidos à avaliação eletrocardiográfica e análise dos biomarcadores sanguíneos: creatina quinase MB (CK-MB), AST (Aspartato aminotransferase) e cálcio ionizado as coletas foram realizadas a cada 48 horas durante um período de 10 dias. A avaliação eletrocardiográfica (ECG) foi executada com equipamento computadorizado (ECGPCVET®, Tecnologia Eletrônica Brasileira) na velocidade de 25mm/seg, registrada nas derivações I, II, III, aVR, aVL e aVF. Para registro da derivação base-ápice, foram acoplados três eletrodos, sendo um eletrodo negativo fixado na porção medial esquerda do pescoço, um eletrodo positivo fixado entre o terceiro e quarto espaço intercostal esquerdo, na altura do olecrano e o eletrodo terra fixado na cernelha do animal estudado. Os traçados eletrocardiográficos foram empregados para avaliar alterações de ritmo e condução elétrica no tecido cardíaco, com base nas medidas da duração de onda P (Pms), duração do intervalo PR, RR e intervalo QTc, duração do complexo QS. A coleta de dados para ECG foi realizada no momento inicial, 10 dias e aos 30 dias, momento final do período experimental com os animais, em repouso.

Avaliações clínicas foram realizadas por um período de 30 dias após a interrupção da administração da planta.

## **Resultados e discussão**

Os marcadores bioquímicos não apresentaram alterações nos ovinos avaliados no decorrer do experimento (Tabela 1).

Os resultados da avaliação eletrocardiográfica (Tabela 2) dos ovinos não revelaram alterações de condução ou ritmo decorrentes da intoxicação por essa planta. Não houve manifestação de sinais clínicos durante ou após a interrupção da administração da planta.

Tabela 1. Dados bioquímicos dos ovinos intoxicados com *Tetrapteryx multiglandulosa*.

| Marcadores               |                   | Ovinos |       |       |       |
|--------------------------|-------------------|--------|-------|-------|-------|
|                          |                   | 01     | 02    | 03    | 04    |
| CK-MB (UI/L)             |                   |        |       |       |       |
|                          | M <sub>00h</sub>  | 235,0  | 263,4 | 331,4 | 263.8 |
|                          | M <sub>48h</sub>  | 169,2  | 280,7 | 316,1 | 274.1 |
|                          | M <sub>96h</sub>  | 121,5  | 300,7 | 244,1 | 286.0 |
|                          | M <sub>144h</sub> | 132,7  | 322,0 | 266,7 | 267.9 |
|                          | M <sub>192h</sub> | 148,0  | 403,2 | 262,2 | 309.5 |
|                          | M <sub>30d</sub>  | 312,4  | 336,5 | 309,9 | 289.3 |
| AST (UI/L)               |                   |        |       |       |       |
|                          | M <sub>00h</sub>  | 65,0   | 62,5  | 60,3  | 277.7 |
|                          | M <sub>48h</sub>  | 58,2   | 62,9  | 61,6  | 274.1 |
|                          | M <sub>96h</sub>  | 50,6   | 63,9  | 61,5  | 194.2 |
|                          | M <sub>144h</sub> | 43,1   | 66,4  | 58,8  | 208.3 |
|                          | M <sub>192h</sub> | 49,9   | 71,2  | 62,5  | 207.1 |
|                          | M <sub>30d</sub>  | 66,4   | 81,2  | 62,4  | 230.1 |
| Cálcio ionizado (mmol/L) |                   |        |       |       |       |
|                          | M <sub>00h</sub>  | 1,05   | 1,07  | 1,04  | 1,08  |
|                          | M <sub>48h</sub>  | 0,95   | 1,24  | 1,25  | 1,22  |
|                          | M <sub>96h</sub>  | 0,95   | 1,16  | 1,29  | 1,12  |
|                          | M <sub>144h</sub> | 1,11   | 1,09  | 1,17  | 1,16  |
|                          | M <sub>192h</sub> | 1,26   | 1,02  | 1,09  | 1,14  |
|                          | M <sub>30d</sub>  | 1,22   | 1,16  | 1,06  | 1,10  |

AST: Aspartato Aminotransferase; CK-MB: creatina quinase fração MB; M<sub>h</sub>: momento em horas; M<sub>30d</sub>: momento 30 dias

Tabela 2. Descrição dos parâmetros eletrocardiográficos individuais dos animais intoxicados, experimentalmente, por *Tetrapteryx multiglandulosa*.

|       |                  | PARÂMETROS |       |        |        |                      |         |
|-------|------------------|------------|-------|--------|--------|----------------------|---------|
| Ovino |                  | FC(bpm)    | P(ms) | PR(ms) | QS(ms) | QT <sub>c</sub> (ms) | RR (ms) |
| 01    |                  |            |       |        |        |                      |         |
|       | M <sub>0d</sub>  | 108        | 50    | 107    | 47     | 335                  | 560     |
|       | M <sub>10d</sub> | 102        | 53    | 103    | 43     | 343                  | 570     |
|       | M <sub>30d</sub> | 82         | 57    | 110    | 50     | 347                  | 740     |
| 02    |                  |            |       |        |        |                      |         |
|       | M <sub>0d</sub>  | 100        | 67    | 117    | 50     | 378                  | 590     |
|       | M <sub>10d</sub> | 88         | 57    | 123    | 53     | 400                  | 610     |
|       | M <sub>30d</sub> | 106        | 53    | 120    | 51     | 363                  | 573     |
| 03    |                  |            |       |        |        |                      |         |
|       | M <sub>0d</sub>  | 124        | 50    | 93     | 47     | 300                  | 620     |
|       | M <sub>10d</sub> | 120        | 50    | 93     | 43     | 323                  | 603     |
|       | M <sub>30d</sub> | 135        | 53    | 90     | 50     | 330                  | 623     |
| 04    |                  |            |       |        |        |                      |         |
|       | M <sub>0d</sub>  | 98         | 60    | 107    | 53     | 337                  | 530     |
|       | M <sub>10d</sub> | 105        | 53    | 103    | 50     | 323                  | 600     |

| M <sub>30d</sub>                                                                                                                                                                                                               | 107 | 57 | 110 | 63 | 310 | 660 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----|-----|----|-----|-----|
| FC: frequência cardíaca; P(ms): duração da onda P (ms); PR(ms) = duração do intervalo PR (ms); QS (ms) = duração do complexo QS (ms); QT <sub>c</sub> (ms)= duração do intervalo QT corrigido; RRms = duração do intervalo RR. |     |    |     |    |     |     |

#### 1.3.4 EXPERIMENTO 4 - Intoxicação experimental por *Vernonia rubricaulis* em ovinos.

##### Material e métodos

O experimento foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentos (CEUA) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o protocolo CEUA-UFMS 657/2015.

Oito ovinos, sem raça definida, com idade entre 3-4 anos e peso médio de 40kg foram utilizados no estudo. No início do experimento, foram vermifugados e identificados por números sequenciais de 1- 8 (Tabela 1). Um mês antes do experimento, cada animal foi canulado com uma cânula intraruminal permanente. Durante um período de sete dias, período de adaptação, e ao longo do experimento, os animais foram mantidos dentro de quatro baias de 5x2m (dois animais por baia), com acesso a água e alimentação correspondente a 2% do seu peso corporal em matéria seca composta por silagem de milho e ração comercial ovina. Um exame clínico era realizado duas vezes ao dia em cada animal.

Para a determinação da atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT) e fosfatase alcalina (AP), e da concentração de glicose, foram colhidas amostras de sangue dos ovinos antes do início do experimento e vários dias depois.

Broto fresco de *V. rubricaulis* foram administrados intraruminalmente aos ovinos nas doses de 2, 3, 6 e 12 mg / kg / peso corporal. Para testar um possível efeito acumulativo da planta, um animal (ovino 8) recebeu na dose de 6 mg / kg / pc dividida em 3 doses de 2 mg / kg / pc com intervalos de 24 horas e outro (ovino 6) foi alimentado com 6 mg / kg / pc dividido em 2 doses de 3 mg / kg / pc com intervalo de 24 horas. Todos os outros animais foram alimentados uma única vez com *V. rubricaulis*. Os ovinos que morreram foram imediatamente necropsiados. O delineamento experimental e os resultados constam na Tabela 1. Foram realizadas biópsias de fígado em todos os animais no dia zero (D0) e em diferentes fases do experimento em três ovinos, nomeadamente ovino 5 (em D0, D4, D7 e D15), ovino 6 (D0 e D2) e Ovino

7 (em D0, D7 e D15 do experimento). A biópsia após D0 não foi disponibilizada nos outros ovinos devido ao curso agudo da doença.

Uma vez que o carboxiatractilosídeos (CAT) está presente em outras plantas que causam hepatotoxicoses com lesão semelhante à encontrada na intoxicação por *V. rubricaulis* (Rissi et al., 2007), uma análise química em busca de uma possível presença de CAT como o princípio tóxico da *V. rubricaulis* foi realizada. Brotos de *V. rubricaulis* foram coletados em 6 de fevereiro de 2017 e 2 de junho de 2017 no município de Campo Grande, MS (S 20°26'34 "W 54 ° 38'47"), submetidos a secagem à temperatura ambiente, triturados e peneirados em uma tela de 2mm. Amostras de *Xanthium strumarium* foram coletadas em 23 de agosto de 2016 próximo a Benson, Cache County, Utah (N 41° 48 '05 "W) secas à temperatura ambiente. Uma solução de 0,01 µg / mL do padrão de carboxiatractilosídeos de potássio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi preparado em metanol: água destilada deionizada (50:50 v:v).

O material vegetal das plantas para a análise de carboxiatractilosídeo foi extraído pesando uma amostra da planta triturada (100 mg) dentro de um tubo de ensaio (8ml) com tampas de rosca revestidas com teflon (Pierce, Rockford, IL, EUA). Metanol (2 mL) foi adicionado aos tubos de teste e colocados em agitador mecânico por 16h, então centrifugado para separar o resíduo vegetal e o extrato de metanol. O extrato do metanol (0,5 mL) foi transferido para um frasco automático de amostra de 1,5 mL. Água destilada deionizada (0,5 mL) foi adicionada ao frasco com extrato de metanol e homogeneizado.

Para analisar a *Vernonia rubricaulis* por HPLC-MS (cromatografia líquida de alta eficiência) para identificação do carboxiatractilosídeos, foi injetada uma amostra (10 µL) para a coluna analítica de fase reversa Betasil-C18 (100 x 2,1 mm, 5 µm) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) protegida por uma coluna de guarda composta com o mesmo material (10 x 2.1 mm, 5 µm) (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EUA).

O carboxiatractilosídeo foi eluído na coluna com fase móvel de 20mM de acetato de amônio acetonitrilo a um fluxo de 0,4 mL /min. A fase móvel foi programada com 20 mM acetato de amônio: acetonitrila, 95:5 v:v durante 1 minuto seguida por um gradiente linear para uma composição de 60:40 v:v 20 mM de acetato de amônio: acetonitrila ao longo de 1 a 8 min. Ao término da fase móvel as amostras foram injetadas usando o sistema HPLC série 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)

e a coluna eluente foi conectada ao *electrospray ionization* da VELOS PRO LTQ (Thermo Scientific). A análise foi realizada com o espectrômetro de massa operando no modo positivo com os seguintes parâmetros operacionais; temperatura capilar 275°C, temperatura do aquecedor da fonte 300 ° C, fluxo de gás de solvatação 40 l/h, fluxo de gás 5 unidades arbitrárias, voltagem da fonte 3,5 kV, corrente da fonte 100 µA a partir de 0-4 min. O excesso de fluxo da coluna foi desviado para descarte, a partir de 4-8 min. o fluxo foi direcionado para a fonte de íons. Foram coletados dados de verificação de massa para uma faixa de 100 a 800 a.m.u. Os cromatogramas reconstruíram íons MH<sup>+</sup>, m / z = 69, tempo de eluição de 7,1 min consistentes com o 0,01 µg / mL de carboxiatractilosídeo de potássio que foi utilizado para identificar o carboxiatractilosídeo nas amostras das plantas.

## Resultados e discussão

Descritos no artigo gerado pela pesquisa: Intoxicação experimental por *Vernonia rubricaulis* em ovinos.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, B.; WRIGHT, G.; GATT, A.; RIDDELL, A.; VEMALA, V.; MALLETT, S.; BURROUGHS, A. Evaluation of coagulation abnormalities in acute liver failure. *Journal of hepatology*, v.57, n. 4, p. 780-786, 2012.
- BACHA, F.B.; PUPIN, R. C.; LEAL, P.V; CARVALHO, N. M.; FRANCO, G. L.; ÍTAVO, C. C.B. F.; RIET-CORREA, F.; LEMOS, R.A.A. Experimental poisoning by *Enterolobium contortisiliquum* in sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.37, n.1, p. 23-30, 2017.
- BANDINELLI, M.B.; BASSUINO, D.M; FREDO, G.; MARI, C.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; PAVARINI, S.P. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, n.9, p.837844, 2014.
- BECKER, M.; CALDEIRA, F. H. B.; CARNEIRO, F. M.; TOKARNIA, C. H.; RIET-CORREA, F.; LEE, S. T.; COLODEL, E. M. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos no Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 9, p.1049-1056, 2013.
- BRUM, K. B.; PURISCO, E.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F. Intoxicação por *Vernonia rubricaulis* em bovinos no Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 22, n.3, p. 119-128, 2002.

- CARDINAL, S. G.; ANIZ, A.C.; SANTOS, B. S.; CARVALHO, N. M.; LEMOS, R. A. A. Lesões perinatais em cordeiros induzidas pela administração de *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) a ovelhas em diferentes estágios de gestação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.1, p. 73-78, 2010.
- CARVALHO, N.M.; ALONSO, L.A.; CUNHA, T.G.; RAVEDUTTI, J.; BARROS, C.S. L.; LEMOS, R.A.A. Intoxicação de bovinos por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, n. 3, p. 139-146, 2006.
- DINIZ, P.P.V.P.; SCHWARTZ, D.S.; COLLICCHIO-ZUANAZE R.C. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dogs: Two cases reports. *Arquivo Veterinária e Zootecnia*, v. 59, p.85-89, 2007.
- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; PURISCO, E. *Vernonia mollissima*, planta tóxica responsável por mortandades de bovinos no sul de MATO GROSSO. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária*. V.11, p. 49-58, 1976.
- DUARTE, A.L.L.; MEDEIROS, R.M.T.; CARVALHO, F.K.L.; LEE, S.T.; COOK, D.; PFISTER, J.A.; COSTA, V.M.M.; RIET-CORREA, F. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia* (*Mascagnia*) *septentrionalis* in goats. *Journal of Applied Toxicology*. P. 2860, 2013.
- DUTRA, F.; ROMERO, A.; QUINTEROS, C.; ARAÚJO, R.; SANTOS, C.G. Poisoning of sheep by *Vernonia plantaginoides* (Less.) Hieron in Uruguay. *J. Vet. Diagn. Invest.* V.28, p.392-398, 2016.
- FREDERICKS, S.; MERTON, G. K.; LERENA, M. J.; HEINING, P.; CARTER, N. D.; HOLT, D. W. Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. *Clinical Chimica Acta*, v. 304, n. 1-2, p. 65–74, Feb. 2001.
- GARDNER, D. Detection of monofluoroacetate in *Palecourea* and *Amorimia* species. *Toxicon*, v. 60, p. 791-796, 2012.
- GAVA, A.; CRISTANI J.; BRANCO J.V.; NEVES D.S.; MONDADORI A.J.; SOUSA R.S. Mortes súbitas em bovinos causadas pela ingestão de *Mascagnia* sp (Malpighiaceae), no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18, p. 16-20, 1998.
- GAVA, A.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA C.H. Intoxicação Experimental por *Vernonia mollissima* (Compositae) em ovinos e bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.V. 7, N.2, P. 33-41, 1987.
- GOPAL, D.V.; ROSEN, H.R. Abnormal findings on liver function tests: interpreting results to narrow the diagnosis and establish a prognosis. *Postgraduate medicine*, v. 107, n. 2, p. 100114, 2000.
- GUNES, V.; OZCAN, K.; CITIL, M.; ONMAZ, A. C.; ERDOGAN, H. M. Detection of myocardial degeneration with point-of-care cardiac troponin assays and histopathology in lambs with white muscle disease. *The Veterinary Journal*, v.184, p. 376-378, 2010.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W. & BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Academic Press, San Diego. p.882-884, 2008.
- KOTOH, K.; ENJOJI, M.; KATO, M.; KOHJIMA, M.; NAKAMUTA, M.; TAKAYANAGI, R.A. new parameter using serum lactate dehydrogenase and alanine



aminotransferase level is useful for predicting the prognosis of patients at an early stage of acute liver injury: A retrospective study. *Comparative Hepatology*, n.7, p.6, 2008.

KREBS, H.C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL, G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacético acid in *Arrabidea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by FNMR spectroscopy. *Toxicon*, v. 32, p. 909-913, 1994.

LEE, S.T.; DOOK, D.; RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.A.; ANDERSON, W. R.; LIMA, F.G. Detection of monofluoroacetato in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon*, v. 60, p. 791-796, 2012.

LEMOES, R. A. A.; LEAL, C. R. B. Doenças de impacto econômico em bovinos de corte: perguntas e respostas. Campo Grande: Ed. UFMS, 450p., 2008.

LEMOES, R. A. A.; GUIMARÃES, E. B.; CARVALHO, N. M.; NOGUEIRA, A. P. A.; SANTOS, B. S.; SOUZA, R. I. C.; CARDINAL, S. G.; KASSAB, H. O. Plant Poisonings in Mato Grosso do Sul. In: 8th International Symposium on Poisonous Plants, Paraíba, Brasil. Anais... p.6872, 2009.

LEONARDI, F.; PASSERI, B.; FUSARI, A.; DE RAZZA, P.; BEGHI, C.; LORUSSO, R.; CORRADI, A.; BOTTI, P. Cardiac troponin I (cTnI) concentration in ovine model of in ovine model of myocardial ischemia. *Research in Veterinary Science*. 85, 141-144, 2008.

MELO, M. M.; VERÇOSA JUNIOR, D.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ, V.; ECCO, R.; PAES, P. R. O. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.3, p.631-640, 2008.

MORRIS, C.A.; TOWERS, N. R.; WHEELER, M.; WESSELINK, C. Selection for or against facial eczema susceptibility in Romney sheep, as monitored by serum concentrations of a liver enzyme, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 38, n. 2, p. 211-219, 1995.

NEUWALD, E. B., SOARES, F. A. C., DREYER, C. T., CARNESELLA, S., WOUTERS, A. T. B., GONZÁLEZ, F. H. D., & DRIEMEIER, D. Increase in Cardiac Troponin I in a Lamb with Tetralogy of Fallot. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75, n. 10, p. 1371–1373, 2013.

OLIVEIRA e SILVA, A.; D'ALBUQUERQUE, L.A.C. Doenças do Fígado, Editora Revinter. 2001, 1433p.

OLIVEIRA, M. D.; RIET-CORREA, F.; CARVALHO, F.K.L.; SILVA, G.B.; PEREIRA, W.S.; MEDEIROS, R.M.T. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca*

(Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, n. 33, v. 6, p. 731-734, 2013.

PANDA, S.; JENA, S. K.; NANDA, R.; MANGARAJ, M.; NAYAK, P. Ischaemic Markers in Acute Hepatic Injury. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, V.10, n.4, p.17–20, 2016.

PAVARINI, S.P.; BANDINELLI, M. B.; JUFFO, G. D.; SOUZA, S. O.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.E.F. Decreased expression of cardiac troponin C is associated with cardiac

- lesions in *Amorimia exotropa* poisoned cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 10, p. 1005-1008, 2012.
- PAVARINI, S.P.; SOARES, M.P.; BANDARRA, P.M.; GOMES, D.C.; BANDINELLI, M.B.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Mortes súbitas em bovinos causadas por *Amorimia exotropa* (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 4, p. 291-296, 2011.
- PEDROSO, P. M.O.; BANDARRA, P. M.; BEZERRA JÚNIOR, 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 Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 5, p. 404-408, 2009
- PEMBERTON, C.J.; YANDLE, T.G.; RADEMAKER, M.T.; CHARLES, C. J.; AITKEN, G.D.; ESPINER, E. A. Amino-terminal proBNP in ovine plasma: evidence for enhanced secretion in response to cardiac overload. *American Physiological Society*. v.275, p. 1200:1208, 1998.
- PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n. 6, p. 752-758, 2013.
- PESSOA, D.A.N.; SILVA, L.C.A.; LOPES, J.R.G.; MACÊDO, M.M.S.; GARINO, J.R. F.; AZEVEDO, S.S.; RIET-CORREA F. Resistance to poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats induced by ruminal inoculation of the bacteria *Pigmentiphaga kullae* and *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 2, p.115-128, 2015.
- PETERS, R.A. Lethal synthesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 139, n. 895, p. 143-170.
- PPM- Produção Pecuária Municipal. 42:1-39, 2014. Disponível em: [http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2014\\_v42\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf). Acesso em: 14.06.2016.
- PURISCO, E.; LEMOS, R. A. A. Intoxicação por *Vernonia* sp. IN: LEMOS, R. A. A.; BRITO, C. R. L. Doenças de impacto econômico em bovinos de corte – perguntas e respostas. editora UFMS, 2008, 450P.
- PURISCO, E.; LEMOS, R.A.A. Intoxicação por *Mascagnia pubiflora*. In: LEMOS, R.A.A. Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: Reconhecimento e Diagnóstico. Campo Grande: Departamento de Medicina Veterinária – Núcleo de Ciências Veterinárias - UFMS, p. 341-343, 1998.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M. Intoxicações por plantas no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a Saúde Pública. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.V. 21, n.1, p. 38-42, 2001.
- SANTOS, A.C.; RIET-CORREA, F.; HECKLER, R.F.; LIMA, S.C.; SILVA, M.L.; REZENDE, R.; CARVALHO, N.M.; LEMOS, R.A.A. Falha na administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio na prevenção da intoxicação por esta substância em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.4, n. 7, p. 649-654, 2014.
- SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V., & BARROS, C. S. Pathogenesis, clinical signs and pathology of diseases caused by hepatotoxic plants

in ruminants and horses in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 1, p. 1-14, 2008.

SMITH, S. C.; LADENSON J. H.; MASON, J. W.; JAFFE, A. S. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis: experimental and clinical correlates. *Circulation*, v.95, n.1, p.163-168, 1997.

SOARES, M. P.; PAVARINI, S. P.; ADRIEN, M. L.; QUEVEDO, P. S.; SCHILD, A. L.; PEIXOTO, P. V.; CRUZ, C. E. F.; DRIEMEIER, D. Amorimia exotropa poisoning as a presumptive cause of myocardial fibrosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 23, n. 6, p. 1223-1229, 2011.

SOUZA, R. I. C.; SANTOS A.C.; RIBAS, N. L. K. S.; COLODEL, E.M.; LEAL, P.V.; PUPIN, R.C.; CARVALHO, N. M.; LEMOS, R.A.A. Doenças tóxicas de bovinos em Mato Grosso do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*.v.36, n.3, p. 1355-1368, 2015.

SOUZA, R.I.C. Estudo retrospectivo de doenças tóxicas e neurológicas em bovinos no estado de Mato Grosso do Sul. 2013. 86f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT. M.S. Enzimas. In Stockham, S. L & Scott. M.S, *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 552-545 p,2011.

STRAVITZ, R. T.; LISMAN, T.; LUKETIC, V. A.; STERLING, R. K.; PURI, P.; FUCHS, M.; SANYAL, A. J. Minimal effects of acute liver injury/acute liver failure on hemostasis as assessed by thromboelastography.

TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J. & PEIXOTO, P.V. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Helianthus, Rio de Janeiro. 310p. 2000.

TOKARNIA, C.H.; BRITO M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.; DOBEREINER, J. *Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de produção*. 2ed. Rio de Janeiro: Helianthus. 586p., 2012.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação de Bovinos por *Vernonia rubricaulis* (Compositae) em Mato Grosso. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. V.2, n.4, p.143-147, 1982.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Vernonia squarrosa* (Compositae) em ovino e bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. V.3, n.2, p.45-52, 1983.

TUNCA, R.; SOZMEN, M.; ERDOGAN, H.; CITIL, M.; OZEN, H.; GOKÇE, E. Determination of cardiac troponin I in the blood and heart of calves with foot-and-mouth disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 20, p. 598-605, 2008.

VARGA, A.; SCHOBER, K.E.; WALKER, W.L; LAKRITZ, J.; MICHAEL RINGS D. Validation of a Commercially Available Immunoassay for the Measurement of Bovine Cardiac Troponin I. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 23 p. 359–365, 2009.

ZACHARY, James F.; MCGAVIN, M. Donald. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Elsevier Health Sciences, 2013.

## Capítulo 2:

Normatizado segundo Periódico: Pesquisa Veterinária Brasileira  
[www.pvb.com.br/br/instructions.pdf](http://www.pvb.com.br/br/instructions.pdf)

### **Modelo experimental para avaliação da resistência à intoxicação por monofluoracetato em ovinos<sup>1</sup>**

Stephanie C. Lima<sup>2</sup>, Kelly Cristina S. Godoy<sup>3</sup>, Rayane C. Pupin<sup>2</sup>, Paula V. Leal<sup>2</sup>, Nilton M. Carvalho<sup>4</sup>, Alda I. Souza<sup>4</sup>, Danilo C. Gomes<sup>4</sup> & Ricardo A.A. Lemos<sup>4</sup>

**ABSTRACT.-** Lima S.C., Godoy K.C.S., Pupin R.C., Leal P.V., Carvalho N.M., Souza A.I., Gomes D.C. & Lemos R.A.A. 2016. [Experimental model to detect sheep resistance to the intoxication by monofluoracetate.]. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil. E-mail: [ricardo.lemos@ufms.com.br](mailto:ricardo.lemos@ufms.com.br)

Plants containing monofluoracetate (MFA) are associated with sudden death in livestock from Australia, South Africa, and Brazil. Research on control methods for this plant toxicosis is actively being developed. A possible method of control is the identification and selection of animals relatively resistant to the effects of MFA through clinical pathology tests. The objectives of this work were to develop an experimental model to identify sheep resistant to MFA by given them increasing non-lethal doses of MFA while detecting possible affected sheep through the determination of the following analytes, MB fraction of creatine kinase (CK-MB), aspartate aminotransferase (AST), blood ionized calcium (BIC), and blood glucose (BG). Five sheep (Group 1) received increasing intraruminal doses of MFA diluted in water for six periods of 3-5 days with an interval of 10 days between each period. Five control sheep (Group 2) received 10ml of intraruminal deionized water following identical periods of feeding and intervals between feedings as sheep from Group 1. Blood was sampled from each sheep in the first day of the experiment, immediately before the MFA or deionized water was administered, and then 48 and 120 hours after the first sampling for determination of serum levels of CK-MB, AST, BIC, and BG. The average values for all sheep for each of the analytes were compared between treated and control groups using the Mann-Whitney non-parametric test with a confidence interval of 5%. Clinical signs when observed included anorexia, apathy, reluctance to move, incoordination, muscle tremors, spreading of hind limbs, and sternal decubitus. Sheep that died were necropsied. No gross lesions were found in the heart. Microscopically lesions in the myocardium were foci of acute necrosis of cardiomyocytes. Sheep did not develop resistance to MFA after several non-lethal doses and there were no significant differences in the levels of CK-MB, AST, BIC, and BG between groups. The detection of subclinically affected sheep by the analytes used in the current experiment proved unfeasible. Crescent non-lethal doses of MFA, as those used in this experiment, allow the identification of toxic dose for each sheep as variations in individual susceptibility.

TERMS OF INDEXATION.- Monofluoracetate, markers for cardiac lesions, myocardium, sheep.

**RESUMO.-** [Modelo experimental para detectar ovinos resistentes à intoxicação por monofluoracetato.] Plantas que contêm monofluoracetato (MFA) são associadas com morte súbita em animais de interesse pecuário da Austrália, África do Sul e Brasil. A pesquisa em métodos de controle está ativamente em desenvolvimento. Um possível método de controle da toxicose causada por essas plantas é a identificação de animais relativamente resistentes aos efeitos de MFA através de exames de patologia clínica. Os objetivos desse trabalho foram desenvolver um modelo experimental para identificar ovinos resistentes ao MFA através da administração de doses não letais crescentes de MFA enquanto era feita a mensuração dos seguintes analitos: fração MB de creatina quinase (CK-MB), aspartato aminotransferase (AST) cálcio ionizado no sangue (BIC) e

<sup>1</sup> Recebido em...

Aceito para publicação em...

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil.

<sup>4</sup> FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS. \* Autor para correspondência: [lap.famez@ufms.br](mailto:lap.famez@ufms.br)

glicose no sangue (BG). Cinco ovinos (Grupo 1) receberam por via intraruminal doses de MFA diluído em água por seis períodos de 3-5 dias com intervalos de 10 dias entre cada período. Cinco ovinos controles (Grupo 2) receberam 10 ml, por via intraruminal, de água deionizada seguindo os mesmos períodos e intervalos usados nos ovinos do Grupo 1. Amostras de sangue foram colhidas de cada ovino no primeiro dia do experimento, imediatamente antes que MFA ou água deionizada fossem administrados e 48 e 120 horas após a colheita para determinação dos níveis de CK-MB, AST, BIC, e BG. Os valores médios de cada analito para todas as ovelhas de cada grupo foram comparados usando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney com um intervalo de confiança de 5%. Os sinais clínicos, quando observados, incluíam anorexia, apatia, relutância em movimentar-se, incoordenação, tremores musculares, afastamento dos membros pélvicos e decúbito esternal. Os ovinos que morreram foram necropsiados. Nenhuma alteração macroscópica foi observada no coração. microscopicamente, as lesões cardíacas consistiam de focos de necrose aguda de cardiomiócitos. Os ovinos não desenvolveram resistência ao MFA após receberem várias doses não letais e não houve diferenças significativas entre os níveis de CK-MB, AST, BIC e BG entre os grupos. A detecção de ovinos subclínicamente afetados pelos analitos usados no presente estudo não foi eficaz. O uso de doses crescentes não letais de MFA, como as usadas neste experimento, permite a identificação da dose tóxica para cada ovino e também variações na susceptibilidade individual.

TERMOS DE INDEXAÇÃO.- Monofluoracetato, marcadores de lesão cardíaca, miocárdio, ovinos.

## INTRODUÇÃO

Plantas tóxicas que causam morte súbita são encontradas principalmente em países como Austrália, África do Sul e Brasil ocasionando prejuízos econômicos (Lee et al. 2014). No Brasil, algumas espécies de plantas causam esta condição, entretanto as pertencentes aos gêneros *Palicourea* e *Amorimia* destacam-se por apresentarem ampla distribuição geográfica (Lee et al. 2012, Tokarnia et al. 2012). A toxicidade destas plantas se deve à presença de monofluoracetato (MFA), substância altamente tóxica que bloqueia o Ciclo de Krebs prejudicando a respiração celular e a produção de energia (Krebs et al. 1994, Lee et al. 2012). Como consequência, ocorre hipocalcemia e aumento dos níveis séricos de glicose. A hipocalcemia se deve ao acúmulo de citrato nos tecidos e no sangue que exerce efeito quelante sobre cálcio (Buffa & Peters, 1949). Já o aumento nos níveis séricos de glicose ocorre pela falta de metabolização hepática de cortisol devido à diminuição da disponibilidade de ATP para os hepatócitos (Ballard & Hyde, 1967).

Os órgãos mais afetados pela ausência de suprimento energético são aqueles que apresentam maiores taxas metabólicas, como cérebro, coração, rins e fígado (Gal et al. 1956, Suzuki 1999). A avaliação ultraestrutural do miocárdio de coelhos intoxicados por *Amorimia exotropa* demonstrou alterações graves nos cardiomiócitos, que são responsáveis pela insuficiência cardíaca aguda e morte súbita dos animais. Devido às dificuldades encontradas no controle e tratamento das intoxicações por plantas que contêm MFA, metodologias alternativas como aversão alimentar condicionada e indução de resistência estão sendo estudadas (Barbosa et al. 2008, Oliveira et al. 2014). Em condições experimentais, ovinos e caprinos submetidos à técnica de aversão alimentar condicionada reduziram o consumo ou passaram a evitar *Palicourea* spp. e *Amorimia* spp. (Barbosa et al. 2008, Oliveira et al. 2014). Apesar dos resultados promissores, a técnica se torna inviável quando se tem uma grande quantidade de animais ou quando há indisponibilidade de alimento. Outro fator que pode contribuir para o insucesso da técnica é a facilitação social, ou seja, a introdução de animais não condicionados no rebanho pode fazer com que os já condicionados passem a consumir a planta novamente (Ralphs, 1997, Kimball et al. 2002).

A inoculação intraruminal de bactérias com capacidade de degradar MFA isoladas do rúmen de caprinos (*Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*), e do solo e das folhas de plantas que contêm MFA (*Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp.), foi capaz de induzir resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, porém a manutenção da resistência adquirida só é possível com a contínua ingestão das bactérias (Pessoa et al. 2015; Silva et al. 2016). Resultados positivos também foram obtidos através do fornecimento de doses crescentes não tóxicas de *Palicourea aneofusca*, *Amorimia septentrionalis* e *Amorimia pubiflora* a caprinos e ovinos (Duarte et al. 2013; Oliveira et al. 2013; Becker et al. 2016). No caso das espécies de *Amorimia* houve transferência da resistência através da transfaunação ruminal (Duarte et al. 2013; Becker et al. 2016).

Por outro lado, a tentativa de indução de resistência com doses não letais de MFA não obteve sucesso (Santos et al. 2014). Apesar disso, esse estudo demonstrou a existência de animais naturalmente resistentes à intoxicação por esta substância. A identificação e seleção destes animais pode ser uma alternativa promissora para a redução de perdas, que pode ser mantida independente do fornecimento contínuo de bactérias ou plantas aos animais. No entanto, para que isso seja possível, torna-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia para identificação de animais resistentes.

Um estudo realizado na Nova Zelândia permitiu selecionar rebanhos de bovinos resistentes ao eczema facial através da exposição dos animais a baixas concentrações de esporidina. A seleção de animais resistentes foi realizada através do monitoramento de gama glutamiltransferase (GGT) para detecção da lesão hepática. Os bovinos que não apresentaram alterações nos padrões enzimáticos foram considerados resistentes (Morris et al., 1991). Uma metodologia semelhante poderia ser utilizada associando a mensuração de enzimas que podem indicar lesão cardíaca à resistência dos animais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo experimental para identificar ovinos resistentes à intoxicação por MFA, através da mensuração de analitos como creatinaquinase fração MB (CK-MB), aspartato-transaminase (AST), cálcio ionizado e glicose em ovinos que receberam doses crescentes e não letais de MFA e verificar a capacidade desses analitos indicarem lesões cardíacas antes da apresentação dos sinais clínicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 ovinos (oito machos e duas fêmeas), previamente canulados, clinicamente sadios, sem raça definida, com 24 meses de idade e pesos entre 30-50 kg, sem contato prévio com qualquer fonte de MFA. Todos foram mantidos em baias individuais, alimentados com feno de Tifton (*Cynodon dactylon*), suplementação concentrada, sal mineral e água à vontade. A metodologia utilizada neste experimento foi adaptada de Santos et al. (2014).

O Grupo 1 (G1) foi constituído por cinco ovinos (1, 2, 3, 4, 5) que receberam doses crescentes não letais de MFA (Sigma-AldrichCo.) diluído em 10 mL de água deionizada, através de cânula ruminal, por seis períodos: 0,05 mg/kg por 5 dias (período 1); 0,08 mg/kg por 4 dias (período 2); 0,08 mg/kg por 4 dias (período 3); 0,1 mg/kg por 3 dias (período 4); 0,1 mg/kg por 3 dias (período 5); 0,25 mg/kg por 3 dias (período 6). Entre cada período houve um intervalo de 10 dias sem a administração, visando minimizar o efeito acumulativo do MFA.

O Grupo 2 (G2) foi composto por outros cinco ovinos (6, 7, 8, 9, 10) que receberam apenas 10 mL de água deionizada, também através de cânula ruminal, nos mesmos períodos e respeitando os mesmos intervalos que os ovinos do G1.

Alíquotas de 5 mL de sangue foram obtidas por punção da veia jugular, acondicionadas em tubos sem anticoagulante até a formação de coágulo, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em tubo plástico tipo Eppendorf® a -80°C até o momento da avaliação. Estas coletas foram realizadas no primeiro dia de cada período (imediatamente antes do fornecimento das doses de MFA ou água deionizada) e 48 e 120 horas após a primeira coleta. Nos intervalos entre os períodos não foram colhidas amostras de sangue.

As dosagens das atividades séricas das enzimas creatina quinase fração MB (CK-MB) e aspartato transaminase (AST) foram utilizadas como indicadores de lesão cardíaca, enquanto os níveis de glicose e cálcio ionizado foram utilizados para detecção dos efeitos indiretos do MFA no organismo (hiperglicemia e hipocalcemia). Os ensaios bioquímicos, realizados por método enzimático, seguiram os protocolos disponibilizados nos kits comerciais (Roche®, Jaguaré, São Paulo, Brasil), com leitura em analisador bioquímico automático (cobas c 111).

No início de cada período era realizado exame físico para avaliação da frequência cardíaca, peso e comportamento. No dia seguinte ao fim de cada período, apenas frequência cardíaca e comportamento eram avaliados. Os animais eram observados a cada seis horas e as observações intensificadas quando havia manifestação de sinais clínicos.

Como o objetivo do experimento foi apenas detectar diferenças na susceptibilidade entre os ovinos e identificar lesões cardíacas antes da apresentação dos sinais clínicos, e não necessariamente causar a morte, todos os ovinos que apresentaram sinais clínicos graves foram tratados com 2 g/kg de acetamida, diluída em água e administrada pela cânula ruminal. Quando os sinais clínicos eram brandos, os animais foram mantidos em repouso até total recuperação.

Nos casos com evolução fatal, realizou-se a necropsia com coleta de fragmentos dos diversos órgãos em formol tamponado 10%, que foram processados rotineiramente para exame histopatológico. O coração de cada animal foi seccionado transversalmente em cinco secções equidistantes (C1, C2, C3, C4 e C5) para avaliação do miocárdio e fragmentos de ventrículo esquerdo e direito, septo interventricular, músculo papilar direito e esquerdo foram coletados. Três corações de ovinos que não apresentavam necrose de cardiomiócitos, foram utilizados como controle negativo durante a avaliação histopatológica.

Os níveis séricos das enzimas CK-MB e AST, assim como os níveis de glicose e cálcio ionizado foram comparados entre os grupos G1 e G2 através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, adotando-se o nível de significância de 5%.

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS e protocolado sob o nº 706/2015.

## RESULTADOS

No período 1, os ovinos do G1 receberam uma dose total de 0,25 mg/kg e não apresentaram quaisquer sinais clínicos de intoxicação por MFA. Os primeiros sinais clínicos de intoxicação foram observados no ovino 1 e ocorreram no segundo período, após o recebimento de 4 doses consecutivas de 0,08 mg/kg (dose total de 0,32 mg/kg). No período 3, os ovinos 1 e 2 se intoxicaram após receberem uma dose total de 0,32 mg/kg. Todos os ovinos que adoeceram nos períodos 2 e 3 se recuperaram espontaneamente. O primeiro caso de intoxicação fatal ocorreu no período 4, após o recebimento de uma dose total de 0,3 mg/kg. O ovino 1 foi encontrado morto sem apresentar sinais clínicos prévios. Nesse mesmo período, o ovino 3 apresentou sinais clínicos graves de intoxicação e recuperou-se 24 horas após o tratamento com acetamida.

No período 5, mesmo após o recebimento de uma dose total de 0,3 mg/kg, nenhum dos animais se intoxicou. No período 6, dois animais (ovinos 4 e 5) que não haviam apresentado sinais clínicos durante o experimento, foram encontrados mortos sem apresentação de sinais clínicos prévios depois de receberem uma dose de 0,25 mg/kg de MFA. Já os ovinos 2 e 3 demonstraram sinais graves de intoxicação após receberem duas doses consecutivas de 0,25 mg/kg. Ambos recuperaram-se 32 e 18 horas, respectivamente, após o tratamento com acetamida. Os ovinos do G2 não apresentaram qualquer alteração na frequência cardíaca ou comportamento durante o experimento. Os sinais clínicos, dose ingerida, frequência cardíaca no início dos períodos e durante a apresentação dos sinais clínicos e desfecho dos ovinos do G1 durante o período experimental estão resumidos no Quadro 1.

Não houve diferença significativa nos níveis séricos de CK-MB, AST, glicose e cálcio ionizado entre os grupos G1 e G2. No entanto, em quatro ocasiões, os níveis séricos de glicose estavam acima do valor de referência para a espécie ovina. No período 2, os ovinos 1 e 2 apresentaram valores de 115,27 e 85,42 mg/dL, respectivamente. Já o ovino 3, apresentou hiperglicemia nos períodos 3 (152,60 mg/dL) e 4 (221,63 mg/dL). Em todos os casos este aumento ocorreu durante a apresentação dos sinais clínicos. Os valores médios de aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase fração MB (CKMB), glicose e cálcio ionizado dos ovinos dos grupos 1 e 2 encontram-se na Fig.1.

Os principais achados de necropsia nos três animais (Ovinos 1, 4 e 5) foram mucosa oral cianótica, edema e congestão pulmonares, hidropericárdio leve a moderado, discretas petéquias multifocais no epicárdio, veias jugulares, pulmonares, cava caudal e cranial moderadamente ingurgitadas, coágulo no ventrículo esquerdo e fígado discretamente aumentado com padrão lobular evidente.

As lesões histológicas foram semelhantes nos três animais e variaram apenas em intensidade. As lesões miocárdicas consistiram principalmente de grupos aleatórios de cardiomiócitos com citoplasma fortemente eosinofílico, homogêneo e núcleo picnótico. Não houve relação entre a gravidade destas lesões no miocárdio e a região topográfica avaliada. Ocasionalmente, agregados de linfócitos foram vistos no miocárdio, assim como poucos cistos de *Sarcocystis* sp. Adicionalmente, os pulmões apresentavam leve preenchimento alveolar por material proteináceo (edema) e congestão, que também foi observada no fígado. Devido à autólise dos túbulos renais, degeneração hidrópico-vacuolar não foi observada. Os demais órgãos não apresentaram alterações. No miocárdio dos ovinos utilizados como controle no exame histopatológico não havia necrose de cardiomiócitos, e foram observados basicamente cistos de *Sarcocystis* sp. e agregados de infiltrado inflamatório de linfócitos e raramente neutrófilos.

## DISCUSSÃO

Os ovinos do presente estudo apresentaram diferenças na susceptibilidade à intoxicação por MFA, porém os níveis séricos dos analitos avaliados (CK-MB, AST, glicose e cálcio ionizado) não foram eficientes para evidenciar estas diferenças e também não foram capazes de indicar lesões cardíacas antes da apresentação dos sinais clínicos.

Apesar de serem identificadas áreas aleatórias de necrose de cardiomiócitos no exame histopatológico, estas lesões não elevaram os níveis séricos de CK-MB e AST. Isto pode estar relacionado ao fato das lesões serem leves ou à especificidade do kit de CK-MB utilizado, já que este é preconizado para uso em humanos e ainda não foi padronizado para uso em ovinos. Resultado semelhante foi observado em um estudo de intoxicação experimental por sementes de *Senna occidentalis*, em que lesões miocárdicas leves foram detectadas no exame histopatológico, porém não houve alterações nos níveis séricos de CK-MB e AST (Lopes et al. 2016). A mensuração de CK-MB utilizando kits humanos é aplicada na detecção de cardiomiopatias principalmente em cães (Fredericks et al. 2001, Diniz et al. 2007), e já foi utilizada experimentalmente para detecção de possíveis lesões cardíacas causadas pela intoxicação por *Amorimia rigida* em camundongos (Melo et al. 2008) e coelhos (Borboleta et al. 2011) e em gatos intoxicados por MFA (Collichio-Zuannaze, 2006).

Neste estudo, alguns ovinos apresentaram hiperglicemia durante a apresentação dos sinais clínicos, enquanto os níveis séricos de cálcio ionizado se mantiveram dentro dos limites fisiológicos para espécie ovina durante todo o experimento. Alterações nos níveis de glicose e cálcio ionizado seriam esperadas considerando-se o mecanismo de ação do MFA, entretanto os níveis de cálcio ionizado se mantiveram normais durante o período experimental, enquanto os níveis de glicose aumentaram em alguns animais somente durante a apresentação dos sinais clínicos. Bosakowski & Levin (1986), descrevem a diminuição do cálcio sérico total em cães, porém em ratos esta alteração não foi observada. Esses autores ainda mencionam aumento da glicemia nessas duas espécies e apontam uma relação inversamente proporcional entre a diminuição do cálcio total e aumento na glicemia e os níveis de citrato sérico. Em ovinos, os níveis séricos de citrato se mantiveram elevados por quatro dias após o recebimento de dose única de MFA (Gooneratne et al. 2008).

Não foram observadas lesões macroscópicas nos corações dos ovinos que morreram durante este experimento, o que também é relatado por autores que reproduziram intoxicação aguda por MFA com doses únicas de 0,5 mg/kg e 1 mg/kg (Peixoto et al. 2010). Santos et al. (2014), relatam a presença de áreas pálidas no miocárdio de um em 13 ovinos necropsiados. Em ovinos intoxicados cronicamente, que receberam doses de 0,8 mg/kg, 1 mg/kg e 2,1 mg/kg, divididas respectivamente em 8 doses de 0,1 mg/kg, 10 doses de 0,1 mg/kg e 42 doses de 0,05 mg/kg, fornecidas durante 41, 66 e 100 dias, o miocárdio apresentou coloração moteada (Shultz et al. 1982).

Apesar dos ovinos terem recebido pequenas doses de MFA durante vários dias, as lesões microscópicas encontradas no miocárdio dos animais foram agudas, caracterizadas por necrose de cardiomiócitos. Lesões miocárdicas agudas também são descritas por Barbosa et al. (2015), que forneceram doses diárias de 0,2 g/kg de *Palicourea marcgravii* a caprinos por até 38 dias. Contrariamente, áreas multifocais de fibrose no miocárdio são relatadas em ovinos que receberam doses letais e subletais fracionadas por até 100 dias (Shultz et al. 1982). Áreas de fibrose também foram encontradas em ovinos que sobreviveram ao desafio com dose única próxima à dose letal de MFA e foram sacrificados 2 anos após o experimento, no entanto os autores não afirmam que essa lesão tenha sido causada pela ingestão de MFA (Gooneratne et al. 2008).

Dados interessantes quanto à sensibilidade individual dos ovinos à intoxicação por MFA foram observados neste estudo. A morte dos ovinos 1, 4 e 5 foi causada por doses menores que as recebidas em períodos anteriores, enquanto o ovino 2 apresentou sinais clínicos no período 2, quando recebeu 0,32 mg/kg e não apresentou quaisquer manifestações de intoxicação nos períodos 3, 4 e 5 quando recebeu doses iguais ou próximas à dose do período 2. Já o ovino 3 não apresentou sinais clínicos no período 2, porém passou a manifestá-los no período 3 quando recebeu a dose do período anterior. No quinto período nenhum dos ovinos se intoxicou, mesmo após a ocorrência de sinais clínicos e morte no período anterior. A ampla variação nas doses letais do MFA em ovinos é descrita (Humphreys, 1988), no entanto em nenhum dos relatos anteriores encontramos menção a existência de diferenças na sensibilidade em um mesmo animal.

Os ovinos do presente estudo demonstraram-se mais sensíveis ao MFA quando comparado a ovinos de estudos anteriores. As doses de 0,2 a 0,5 mg/kg de MFA causaram sinais clínicos de intoxicação ou morte de alguns ovinos, diferente do relatado por Santos et al. (2014), que observaram sinais clínicos apenas no sexto período experimental, quando os ovinos haviam recebido dose total de 0,75 mg/kg. Além disso, após o desafio com 1 mg/kg, três ovinos se recuperaram e dois não apresentaram sinais clínicos.

O efeito acumulativo do MFA poderia ser sugerido como causa desta maior sensibilidade encontrada neste estudo, já que os intervalos entre períodos foram reduzidos comparando-se à metodologia original de Santos et al. (2014). Esses autores utilizaram intervalos de 10 dias entre os períodos, até o período 3 e a partir do período 3 o intervalo passou a ser de 15 dias. No entanto, alguns dos nossos resultados eliminam esta hipótese, como por exemplo, o início dos sinais clínicos de intoxicação que ocorreram no período 2, quando o intervalo entre os períodos era o mesmo utilizado por Santos et al. (2014). Outro fato que reforça a ausência do efeito acumulativo é a ausência de sinais de intoxicação no quinto período, mesmo após a apresentação de sinais clínicos pelo ovino 3 e a morte do ovino 1 no período anterior.

Mesmo com um objetivo diferente, nossos resultados também reforçam os obtidos por Santos et al. (2014) de que doses subletais de MFA não induzem resistência em ovinos. Em outras espécies como águias, ratos, camundongos e macacos, o fornecimento de doses subletais levou a um aumento na tolerância, comprovado pelo desafio com doses letais. Contrariamente, em cães, cobaias, coelhos e patos selvagens, a administração de doses subletais ocasionou a intoxicação fatal.

Apesar do presente estudo não apresentar êxito na detecção da diferença de sensibilidade dos ovinos à intoxicação por MFA através dos analitos avaliados, a metodologia experimental utilizando doses crescentes e não letais demonstrou-se apropriada para este tipo de experimento, já que possibilita identificar a dose tóxica para cada animal, assim como variações na sensibilidade individual.



## REFERÊNCIAS

- Albuquerque S.S.C., Rocha B.P., Almeida V.M., Oliveira J.S., Riet-Correa F., Lee S.T., Evêncio Neto J. & Mendonça F.S. 2014. Fibrose cardíaca associada à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(5):433-437.
- Bandinelli M.B., Bassuino D.M., Fredo G., Mari C., Driemeier D., Sonne L. & Pavarini S.P. 2014. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. *Pesq. Vet. Bras.* 34(9):837-844.
- Barbosa, R.R., Silva, I.P., Soto-Blanco, B. 2008. Development of conditioned taste aversion to *Mascagnia rigida* in goats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.v.28 (12), p. 571-574.
- Barbosa, E.F.G., Cardoso, S.P., Cabral Filho, S.L.S., Borges, J.R.J., Lima, E.M.M., Riet-Correa, F., Castro, M.B. 2015. Sinais clínicos e patologia da intoxicação crônica experimental de caprinos por *Palicourea marcgravii*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(3):209-215.
- Bosakowski T. & Levin A.A. 1986. Serum citrate as a peripheral indicator of fluoroacetate and fluorocitrate toxicity in rats and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85:428-436.
- Becker, M., Caldeira, F.H.B., Carneiro, F.M., Oliveira, L.P., Tokarnia, C.H., Riet-Correa, F., Lee, S.T., Colodel, E.M. 2013. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos em Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* v.33 (9), p. 1049-1056.
- Borboleta, L.R., Labarrère, C.R., Ribeiro, A.F.C., Paes-Leme, F.O., Paes, P.R.O., Ocarino, N.M., Melo, M.M. 2011. Perfil bioquímico sanguíneo na intoxicação experimental com extrato de *Mascagnia rigida* (A. Juss.) Griseb. (Malpighiaceae) em coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.5, p.1113-1123
- Collicchio-Zuanaze, R.C. Perfil hematológico, bioquímico, histopatológico e toxicológico de gatos induzidos experimentalmente com monofluoroacetato de sódio. Botucatu, 2006, 168p. Defesa de Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, 2006. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Diniz, P.P.V.P., Schwartz, D.S., Collicchio-Zuanaze, R.C. 2007. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dog: two case reports. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 59 (1),p. 85-89.
- Duarte A.L.L., Medeiros R.M.T., Carvalho F.K.L., Lee S.T., Cook D., Pfister J.A., Costa V.M.M. & Riet-Correa F. 2013. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia* (*Mascagnia*) *septentrionalis* in goats. *J. Appl. Toxicol.* v. 34(2):220-223.
- Fredericks, S.; Merton, G. K.; Lerena, M. J.; Heining, P.; Carter, N. D.; Holt, D. W. 2001. Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. *Clinical Chimica Acta*, v. 304, p. 65–74.
- Giannitti, F., Anderson, M., Caspe, S.G., Mete, A., East, N.E, Mostrom, M., Poppenga, R. 2013. An outbreak of sodium fluoracetate (1080) intoxication in selenium and copper-deficient sheep in California. *Veterinary Pathology*. V. 50(6), p. 1022-1027.
- Humphreys D.J. 1988. *Veterinary Toxicology*. 3rd ed. Bailliere Tindall, London. 356p.
- Krebs H.C., Kemmerling W. & Habermehl G. 1994. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-NMR spectroscopy. *Toxicon* 32:909-913.
- Kimball B.A., Provenza F.D. & Burritt E.A. 2002. Importance of alternative foods on the persistence of flavor aversions: implications for applied flavor avoidance learning. *Applied Animal Behaviour Science*. v. 76, p.249-258.
- Lee S.T., Cook D., Riet-Correa F., Pfister J.A., Anderson W.R., Lima F.G. & Gardner D. 2012. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon* 60:791-796.
- Lee, S. T., Cook, D., Pfister, J. A., Allen, J. G., Colegate, S. M., Riet-Correa, F. & Taylor, C. M. 2014. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 62, p. 7345-7354.
- Lopes D.I.S., Sousa, M.G., Ramos, A.T., Maruo, V.M. 2016. Cardiotoxicity of *Senna occidentalis* in sheep (*Ovis aries*). *Open Veterinary Journal*. v.6 (1), p. 30-35.
- Melo, M.M., Verçosa Júnior, D., Pinto, M.C.L., Silveira, J.B., Ferraz, V., Ecco, R., Paes, P.R.O. 2008. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. *Arq. Bras. Vet. Zootec.* v.60 (3), p. 631-640.
- Morris, C.A., Towers, N.R., Tempero, H.J. 1991. Breeding for resistance to facial eczema in dairy cattle. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. v. 53, p. 221-224.

- Nogueira V.A., França T.N., Peixoto T.C., Caldas S.A., Armien A.G. & Peixoto P.V. 2010. Intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(7):533-540.
- Oliveira M.D., Riet-Correa F., Carvalho F.K.L., Silva G.B., Pereira W.S. & Medeiros R. M.T. 2013. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):731-734.
- Oliveira, M.D., Riet-Correa, F., Silva, G.B., Pereira, W.S., Freire, L.F.S., Medeiros, R.M.T. 2014. Aversão alimentar condicionada para o controle da intoxicação por *Palicourea aeneofusca*. *Ciência Rural*, v. 44 (7), p. 1246-1248.
- Peixoto T.C., Nogueira V.A., Coelho C.D., Veiga C.C.P., Peixoto P.V. & Brito M.F. 2010. Avaliações clínico-patológicas e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(12):1021-1030.
- Peixoto, T.C., Oliveira, L.I., Caldas, S.A., Catunda Junior, F.E.A., Carvalho, M.G., França, T.N. 2012. Efeito protetor da acetamida sobre as intoxicações experimentais em ratos por monofluoroacetato de sódio e por algumas plantas brasileiras que causam morte súbita. *Pesq. Vet. Bras.* v.31(11):938-52.
- Peixoto, T.C., Nogueira, V.A., Caldas, S.A., França, T.N., Anjos, B.L., Aragão, A.P. & Peixoto, P.V. 2012. Efeito protetor da acetamida em bovinos indica monofluoroacetato como princípio tóxico de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Pesq. Vet. Bras.* v.32 (4):219-328.
- Pessoa, D.A.N., Silva, L.C.A., Lopes, J.R.G., Macêdo, M.M.S., Garino Junior, F., Azevedo, S.S. & Riet-Correa, F. 2015. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 35, n. 2, p.115-128.
- Ralphs M.H. 1997. Long term retention of aversions to tall larkspur in naive and native cattle. *Journal of Range Management.* v. 50, p. 367-370.
- Ralphs M.H. 2001. Plant toxicants and livestock: prevention and management, p.441-470. In: Hui Y.H., Smith R.A. & Spoerke Jr D.G. (Ed.), *Foodborne Disease Handbook*. 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
- Santos A.C., Riet-Correa F., Heckler R.F., Lima S.C., Silva M.L., Rezende R., Carvalho N.M. & Lemos R.A.A. 2014. Administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio não protege contra a intoxicação por este composto em ovinos, *Pesq. Vet. Bras.* v. 34(7):649-654.
- Schons S.V., Mello T.L., Riet-Correa F. & Schild AL. 2011. Poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septium* in sheep in northern Brazil. *Toxicon* 57:781-786.
- Silva, L.C.A, Pessoa, D.A.N, Lopes, J.R.G., Albuquerque, L.G., Silva, L.S.A., Garino Júnior, F., Riet-Correa, F. 2016. Protection against *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by the continuous administration of sodium monofluoroacetate-degrading bacteria. *Toxicon*. 111: 65-68.
- Soares M.P., Pavarini S.P., Adrien M.L., Quevedo P.S., Schild A.L., Peixoto P.V., Farias da Cruz C.S. & Driemeier D. 2011. *Amorimia exotropa* poisoning as a presumptive cause of myocardial fibrosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* v. 23(6):1223-1229.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas tóxicas do Brasil. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 586p.

#### Legendas das figuras

Fig.1. Valores médios de aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase fração MB (CKMB), glicose e cálcio ionizado dos ovinos dos Grupos 1 e 2.

Quadro 1. Principais dados sobre o período experimental, dose recebida, sinais clínicos, frequência cardíaca de cada período e desfecho da indução a resistência à administração de monofluoroacetato em ovinos.

|                       | <b>Dose recebida</b>  | <b>Frequência cardíaca inicial</b> | <b>Frequência cardíaca final</b> | <b>Sinais clínicos</b>                                                                                              | <b>Desfecho</b>                        |
|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Período 1</b>      |                       |                                    |                                  |                                                                                                                     |                                        |
| Ovinos 1, 2, 3, 4 e 5 | 5 doses de 0,05 mg/kg |                                    | -                                | Nenhum animal apresentou sinais clínicos                                                                            | Nenhum animal se intoxicou             |
| <b>Período 2</b>      |                       |                                    |                                  |                                                                                                                     |                                        |
| Ovino 1               | 4 doses de 0,08 mg/kg | 60 bpm*                            | NA**                             | Anorexia, apatia, relutância em movimentar-se, afastamento dos membros pélvicos, incoordenação, tremores musculares | Recuperação                            |
| Ovino 2               | 4 doses de 0,08 mg/kg | 73 bpm                             | 109 bpm                          | Anorexia, apatia, relutância em movimentar-se e afastamento dos membros pélvicos.                                   | Recuperação                            |
| Ovinos 3, 4 e 5       | 4 doses de 0,08 mg/kg | -                                  | -                                | Não apresentaram sinais clínicos                                                                                    | Nenhum animal se intoxicou             |
| <b>Período 3</b>      |                       |                                    |                                  |                                                                                                                     |                                        |
| Ovino 1               | 4 doses de 0,08 mg/kg | 62 bpm                             | 77 bpm                           | Anorexia, incoordenação.                                                                                            | Recuperação                            |
| Ovino 3               | 4 doses de 0,08 mg/kg | 55 bpm                             | 163 bpm                          | Anorexia, apatia, incoordenação, membros pélvicos afastados e decúbito esternal.                                    | Recuperação                            |
| Ovinos 2, 4 e 5       | 4 doses de 0,08 mg/kg | -                                  | -                                | Não apresentaram sinais clínicos                                                                                    | Nenhum animal se intoxicou             |
| <b>Período 4</b>      |                       |                                    |                                  |                                                                                                                     |                                        |
| Ovino 1               | 2 doses de 0,1 mg/kg  | 57 bpm                             | NA                               | Ausência de sinais clínicos.                                                                                        | Morte                                  |
| Ovino 3               | 3 doses de 0,1 mg/kg  | 55 bpm                             | 77 bpm                           | Anorexia, apatia, incoordenação, membros pélvicos afastados, tremores musculares, quedas frequentes.                | Recuperação (tratamento com acetamida) |
| Ovinos 2, 4 e 5       | 3 doses de 0,1 mg/kg  | -                                  | -                                | Não apresentaram sinais clínicos                                                                                    | Nenhum animal se intoxicou             |
| <b>Período 5</b>      |                       |                                    |                                  |                                                                                                                     |                                        |
| Ovinos 2, 3, 4 e 5    | 3 doses de 0,1 mg/kg  | -                                  | -                                | Não apresentaram sinais clínicos                                                                                    | Nenhum animal se intoxicou             |
| <b>Período 6</b>      |                       |                                    |                                  |                                                                                                                     |                                        |
| Ovino 2               | 2 doses de 0,25 mg/kg | 69 bpm                             | 101 bpm                          | Incoordenação e tremores musculares.                                                                                | Recuperação (tratamento com acetamida) |
| Ovino 3               | 2 doses de 0,25 mg/kg | 63 bpm                             | 81 bpm                           | Incoordenação e tremores musculares.                                                                                | Recuperação (Tratamento com acetamida) |
| Ovino 4               | 1 dose de 0,25 mg/kg  | 62 bpm                             | NA                               | Ausência de sinais clínicos.                                                                                        | Morte                                  |
| Ovino 5               | 1 dose de 0,25 mg/kg  | 52 bpm                             | NA                               | Ausência de sinais clínicos.                                                                                        | Morte                                  |

bpm – batimentos por minuto.

\*\*NA – não avaliado.

## Capítulo 3:

Normalizado segundo Periódico: Toxicon

[https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/259?generatepdf=true](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/259?generatepdf=true)

### **Toxicidade dos diferentes estágios vegetativos de *Amorimia pubiflora* em ovinos**

[Toxicity of the different vegetative stages of *Amorimia pubiflora* to sheep]

Stephanie C. Lima<sup>a</sup>, Kelly C.S. Godoy<sup>b</sup>, Paula V. Leal<sup>c</sup>, Stephen T. Lee<sup>d</sup>, Jim Pfister<sup>d</sup>, Alda I. Souza<sup>e</sup>, Claudio S. L. de Barros<sup>f</sup>, Ricardo A. A. de Lemos<sup>f</sup>

<sup>a</sup>Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil. [stephanie\\_k\\_lima@hotmail.com](mailto:stephanie_k_lima@hotmail.com)

<sup>b</sup>Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ, UFMS, Av. Senador Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil.: [k.c.s.godoy@gmail.com](mailto:k.c.s.godoy@gmail.com)

<sup>c</sup>Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ, UFMS, Av. Senador Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil. [paulavleal@hotmail.com](mailto:paulavleal@hotmail.com)

<sup>d</sup>Poisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N., Logan, UT 84341, USA.

<sup>e</sup>Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, FAMEZ, UFMS, Av. Senador Felinto Muller, 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>f</sup>Laboratório de Patologia Veterinária (LAP) FAMEZ, UFMS, Av. Senador Felinto Muller, 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

### **Resumo**

Plantas tóxicas que contêm monofluoracetato causam morte súbita em animais de produção na Austrália, África do Sul e Brasil acarretando prejuízos econômicos para os produtores. Este estudo teve como objetivo determinar a quantidade de MFA presente em brotos, folhas maduras, folhas velhas e sementes de *Amorimia pubiflora* colhidas em diferentes épocas do ano e seu efeito tóxico em ovinos. Amostras de *Amorimia pubiflora* foram colhidas durante os meses de abril, agosto e dezembro de 2015 e março de 2016, separadas de acordo com o estágio vegetativo (brotos, sementes, folhas maduras e velhas), dessecadas em estufa e fornecidas em doses diárias equivalentes a 5 g/kg de folhas frescas a ovinos através de cânula ruminal. O experimento foi dividido em quatro etapas de acordo com a época de coleta da planta, de forma que em cada uma delas um ovino recebeu um estágio vegetativo da planta (brotos, folhas maduras e velhas). Apenas na segunda etapa do experimento foi possível coletar sementes de *A. pubiflora* e estas foram fornecidas a um ovino seguindo a mesma metodologia das folhas. A planta foi administrada até

que os animais apresentassem sinais clínicos de intoxicação ou até o término da quantidade de planta. Alíquotas de folhas e sementes de *A. pubiflora* fornecidas aos ovinos foram enviadas para dosagem de monofluoracetato. Todos os estágios vegetativos da planta foram tóxicos durante o experimento, mas os maiores níveis de monofluoracetato foram detectados em sementes e brotos. Folhas maduras (colhidas em agosto e dezembro) e velhas (colhidas em dezembro) também causaram intoxicação fatal. Nossos resultados demonstram que *A. pubiflora* pode ser tóxica mesmo quando as concentrações de MFA são baixas, evidenciando que a simples presença desta substância é um fator de risco para a ocorrência da intoxicação. O conhecimento do princípio tóxico e suas variações nos permite determinar a patogenia das intoxicações, assim como condições de ocorrência, possíveis tratamentos, controle e profilaxia, contribuindo significativamente para a diminuição de perdas econômicas a campo devido às intoxicações por essas plantas.

**Palavras – chave:** *Amorimia pubiflora*, Monofluoracetato, Morte súbita, Plantas tóxicas

## Introdução

Plantas tóxicas que causam morte súbita em animais de produção são encontradas principalmente em países como Austrália, África do Sul e Brasil ocasionando importantes prejuízos econômicos (Lee et al., 2014). O princípio tóxico detectado, na maioria dessas plantas é o monofluoracetato (MFA), atualmente reconhecido e quantificado pela adaptação do método HPLC-APCI-MS por Lee et al. (2012), metodologia que anteriormente era aplicada apenas na identificação desse composto em alimentos.

A toxicidade do MFA é resultante da ação do seu metabólito ativo, o fluorocitrato, produzido por meio da “síntese letal”, que interrompe o Ciclo de Krebs e a produção de adenosina trifosfato (ATP), prejudicando órgãos com maiores taxas metabólicas, como o coração (Krebs et al., 1994, Santos et al., 2014).

Na Austrália, plantas que contêm MFA pertencem aos gêneros *Gastrolobium* e *Oxylobium*, estão amplamente distribuídas, acometem bovinos, ovinos, caprinos e

equinos e são consideradas importantes causas de perdas econômicas para pecuaristas (Lee et al., 2014). Na África do Sul, *Dichapetalum cymosum* também conhecida como “gifblaar” é considerada a terceira planta tóxica mais importante da região, responsável por 8% das mortes de bovinos intoxicados por plantas e micotoxinas (Kellerman et al., 2005).

No Brasil estima-se que 50% das mortes de bovinos causadas por plantas sejam devido à ingestão de espécies que contêm MFA. Dentre elas destacam-se plantas dos gêneros *Palicourea* e *Amorimia* por apresentarem ampla distribuição geográfica e boa palatabilidade. O MFA foi identificado em *P. marcgravii*, *P. aeneofusca*, *P. amapaensis*, *P. grandiflora*, *P. aff. juruana*, *P. longiflora*, *P. aff. longiflora*, *P. macarthurorum*, *P. nigricans*, *P. vacillans*, *P. barraensis*, *A. amazonica*, *A. camporum*, *A. exotropa*, *A. pubiflora*, *A. rigida*, *A. septentrionalis* e *Tanaecium bilabiatum*. Apesar de causar quadros de morte súbita, MFA não foi encontrado em *Pseudocalymma elegans* (Lee et al., 2012; Tokarnia et al., 2012). O diagnóstico presuntivo de intoxicações por MFA ou plantas com este princípio tóxico pode ser realizado com base no histórico, sinais clínicos apresentados pelos animais, achados de necropsia e presença das plantas nas propriedades.

A confirmação pode ser realizada através da observação de degeneração hidrópico-vacuolar nos túbulos contorcidos distais dos rins e da detecção do princípio em amostras biológicas, porém a confirmação por estes métodos é difícil, já que os animais acometidos nem sempre apresentam alterações tubulares e a meia-vida do MFA é curta no organismo restringindo seu período de identificação em amostras biológicas (Nogueira et al., 2011; Tokarnia et al., 2012). Recentemente, a detecção de MFA na cera da orelha de bovinos intoxicados experimentalmente com *P. marcgravii* demonstrou-se um método diagnóstico promissor, pois além de ser menos invasivo, pode ser realizado em animais vivos e permite a identificação de animais que ingeriram a planta há pelo menos um mês (Shokry et al., 2017).

Experimentos realizados com plantas do gênero *Palicourea* e *Amorimia*, demonstraram que há variação em sua toxicidade de acordo com a época do ano e com o estágio vegetativo em que se encontram (brotos, folhas maduras, folhas velhas e sementes) (Tokarnia et al., 2012; Becker et al., 2013), contudo não existem

estudos que quantifiquem a variação do princípio tóxico nos diferentes estágios vegetativos, épocas do ano e seu efeito nos animais. Esse é um aspecto fundamental para a avaliação de risco de ocorrência da intoxicação espontânea, pois a partir do conhecimento das variações do MFA nos diferentes estágios vegetativos da planta e nos diferentes períodos do ano, é possível adotar medidas de manejo que evitem a introdução de animais em áreas com a presença da planta nos momentos em que esta é mais tóxica. Este tipo de estudo se torna ainda mais relevante pelo fato de poder ser aplicado a qualquer espécie de planta que contenha MFA.

O objetivo deste estudo foi determinar a quantidade de MFA presente em brotos, folhas maduras, folhas velhas e sementes de *Amorimia pubiflora* colhidas em diferentes épocas do ano e seu efeito tóxico em ovinos.

### **Material e métodos**

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS e protocolado sob o nº 537/2013.

As amostras de *A. pubiflora* utilizadas no experimento foram colhidas em uma propriedade localizada a 20° 24' 32.56"S, 56° 20' 31.85"O no município de Miranda no Estado de Mato Grosso do Sul, onde surtos de intoxicação pela planta foram relatados pelo proprietário. Para padronizar as amostras colhidas, áreas com elevada densidade da planta dentro de um mesmo piquete foram cercadas com gaiolas teladas para evitar o acesso de bovinos. Posteriormente estas áreas foram roçadas e deixadas em repouso por um período de 60 dias objetivando a brotação da planta. Após este período, foram realizadas coletas sucessivas a cada quatro meses, aproximadamente.

O experimento foi realizado em quatro períodos, de acordo com a época de coleta da planta (04/2015, 08/2015, 12/2015 e 03/2016), de forma que todos os procedimentos descritos a seguir foram repetidos em cada um deles. O tempo entre as coletas da planta e o início dos experimentos variou de 14 a 35 dias.

A cada coleta as folhas eram separadas em brotos (folhas verde claras, pequenas, macias, localizadas na porção mais apical da planta), folhas maduras (folhas verde claras, de tamanho médio, um pouco mais fibrosas que os brotos,

localizadas na porção intermediária da planta) e folhas velhas (folhas verdes escuras, grandes, fibrosas, localizadas na porção basal da planta). Quando presentes, as sementes também eram colhidas. Após, as amostras eram depositadas em sacos plásticos, acondicionadas em caixa de isopor com gelo reciclável e transportadas à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, onde passavam por dessecação em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Posteriormente, as folhas e sementes dessecadas eram trituradas em moinho com peneira de 2mm e armazenadas em sacos plásticos vedados. Para o cálculo da perda de água, 1 kg de folhas frescas de cada categoria era pesado após a dessecação e a porcentagem de redução do peso era usada no cálculo das doses fornecidas aos ovinos. O mesmo foi feito com as sementes.

Alíquotas da planta dessecada foram enviadas ao *Toxic Plant Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Logan, UT, USA* para dosagem do monofluoacetato através do método HPLC–APCI–MS (Lee et al., 2012). O tempo entre a coleta das amostras e o envio para dosagem de MFA foi de dois meses para as amostras do primeiro período, 14 meses para as do segundo, 8 meses para as do terceiro e 4 meses para as do quarto período.

Para avaliar a toxicidade, cada estágio vegetativo da planta dessecada foi fornecido a um ovino, em doses diárias equivalentes a 5 g/kg de folhas frescas, através de cânula ruminal. A administração da planta era interrompida se o animal apresentasse sinais clínicos de intoxicação ou ao término da planta.

Todos os ovinos utilizados no experimento eram provenientes de áreas sem a ocorrência de plantas que causam morte súbita, sem raça definida, adultos, pesando entre 23 e 51 kg, previamente vermifugados (Ripercol®). Os animais foram mantidos em baias individuais, teladas, de 2,0 m<sup>2</sup> e piso de chão, alimentados ração comercial para a espécie (equivalente a 1% do PV), silagem de milho, sal mineral e água à vontade. Cada animal foi submetido a um exame clínico completo antes do fornecimento da planta, com realização de novo exame clínico durante a apresentação de sinais clínicos da intoxicação.



Os ovinos que morreram foram necropsiados e todos os órgãos foram coletados e fixados em formol tamponado a 10%. Após a fixação, os fragmentos clivados passaram por processamento histológico de rotina.

## Resultados

Todos os estágios vegetativos da planta apresentaram toxicidade durante o período experimental, porém as sementes e os brotos demonstraram ser mais tóxicos. As concentrações de monofluoracetato em *Amorimia pubiflora* de acordo com os estágios vegetativos e períodos do ano, dose da planta administrada a cada ovino e desfecho clínico encontram-se dispostos no Quadro 1.

**Quadro 1. Concentração de monofluoracetato em *Amorimia pubiflora* de acordo com os estágios vegetativos e períodos do ano, dose de planta administrada a cada ovino e desfecho clínico durante o período experimental.**

| Ovinos                           | Peso (kg) | Fase vegetativa da planta | Dose total de planta administrada (g/kg) | Concentração deMFA (µg/mg) | Dose total MFA administrado (mg) | Desfecho clínico |
|----------------------------------|-----------|---------------------------|------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------|
| <b>Planta colhida em 04/2015</b> |           |                           |                                          |                            |                                  |                  |
| 01                               | 33,4      | brotos                    | 20                                       | 0,140                      | 93,52                            | Morte            |
| 02                               | 37,0      | maduras                   | 50                                       | 0,120                      | 222,0                            | Não morreu       |
| 03                               | 45,0      | velhas                    | 105                                      | 0,067                      | 31,65                            | Não morreu       |
| <b>Planta colhida em 08/2015</b> |           |                           |                                          |                            |                                  |                  |
| 04                               | 23,0      | brotos                    | 10                                       | 0,012                      | 2,88                             | Não morreu       |
| 05                               | 29,8      | maduras                   | 15                                       | 0,018                      | 7,95                             | Morte            |
| 06                               | 51,1      | velhas                    | 15                                       | 0,007                      | 5,38                             | Não morreu       |
| 07                               |           | Sementes                  | 5                                        | 0,100                      | 21,0                             | Morte            |
| <b>Planta colhida em 12/2015</b> |           |                           |                                          |                            |                                  |                  |
| 08                               | 33,5      | brotos                    | 10                                       | 0,140                      | 46,90                            | Morte            |
| 09                               | 27,5      | maduras                   | 40                                       | 0,008                      | 9,13                             | Morte            |
| 10                               | 46,5      | velhas                    | 90                                       | 0,009                      | 39,33                            | Morte            |
| <b>Planta colhida em 03/2016</b> |           |                           |                                          |                            |                                  |                  |
| 11                               | 32,0      | brotos                    | 10                                       | 0,220                      | 70,40                            | Morte            |
| 12                               | 44,5      | maduras                   | 45                                       | 0,021                      | 42,05                            | Não morreu       |
| 13                               | 39,5      | velhas                    | 175                                      | 0,021                      | 145,16                           | Não morreu       |

Em todas as etapas, os ovinos aos quais foram fornecidas folhas maduras e velhas receberam maior número de doses. Este fato deve-se à maior disponibilidade de folhas maduras e velhas de *A. pubiflora* presentes nas áreas isoladas para coleta, que sempre foram superiores à quantidade de brotos. Apenas no mês de agosto/2015 coletou-se sementes da planta, que demonstraram ser a parte mais tóxica, com dose letal de 5 g/kg e maior concentração de MFA quando comparada às folhas. Com exceção do ovino 4, todos os que consumiram brotos morreram, independente do período do ano. Dentre os que consumiram folhas velhas apenas o ovino 10 morreu. Os animais que apresentaram sinais clínicos da intoxicação morreram. A evolução clínica variou entre 2h30 e 96 horas até o óbito. Os principais sinais clínicos foram a apatia, anorexia, decúbito esternal, tremores musculares, incoordenação motora e quedas.

As alterações observadas na necropsia consistiram em mucosa oral levemente cianótica, ingurgitamento de grandes vasos, hidropericárdio discreto e edema pulmonar leve a moderado. No exame histopatológico não foram observadas lesões significativas em nenhum dos animais.

## Discussão

*Amorimia pubiflora*, nas doses empregadas, demonstrou ser potencialmente tóxica para ovinos em todas as épocas do ano e em todos os estágios vegetativos, porém a planta foi mais tóxica no mês de dezembro, quando todos os estágios vegetativos causaram intoxicação fatal. Observou-se maior concentração do princípio tóxico nos brotos e sementes, exceto no período de agosto, quando a concentração de MFA foi maior nas folhas maduras. Relatos anteriores (Tokarnia et al., 2012; Becker et al., 2013) descrevem maior toxicidade dos brotos e sementes de *A. pubiflora* com base na quantidade de planta necessária para causar intoxicação fatal, porém, até o momento, não há estudos comparando a concentração do princípio tóxico nos diferentes estágios vegetativos.

A única ocasião em que a brotação da planta não demonstrou ser tóxica foi em agosto. Entretanto, se compararmos os teores de MFA encontrados nestes brotos aos detectados em folhas maduras e velhas colhidas em dezembro, que

causaram intoxicação fatal, notamos que os brotos de agosto continham 1,5 e 1,3 vezes mais MFA que as folhas maduras e velhas de dezembro, respectivamente. O fato dos ovinos não apresentarem intoxicação após a ingestão da brotação de agosto sugere que outros fatores além da concentração do princípio ativo podem estar envolvidos na ocorrência da intoxicação. Um dos possíveis fatores é a variação na sensibilidade individual dos ovinos ao MFA, que já foi demonstrada em experimentos com plantas que contêm esse princípio (Becker et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Barbosa et al., 2015), assim como com o princípio em sua forma pura (Peixoto et al., 2010; Santos et al., 2014). A menor suscetibilidade de alguns animais ao MFA é atribuída à presença intrarruminal ou à ingestão de bactérias com capacidade de degradar esta substância (Duarte et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Pessoa et al., 2015; Silva et al., 2016; Becker et al., 2016).

Ainda considerando os resultados das dosagens de MFA obtidas nas amostras de agosto em nosso experimento, podemos atribuir a maior frequência dos casos de intoxicação espontânea relatados em Mato Grosso do Sul entre os meses de agosto e setembro à carência alimentar e não a maior concentração do princípio tóxico na planta. Neste período há redução na oferta de pastagem e brotação de *A. pubiflora* (Tokarnia et al., 2012), fatores que favorecem sua ingestão. Essa observação é fundamental para o controle da intoxicação, pois o manejo alimentar adequado dos bovinos nesta época pode reduzir o risco de intoxicações.

Destaca-se que no presente estudo a coleta das amostras foi realizada sempre no mesmo local, de modo que as mesmas plantas eram coletadas diversas vezes durante o ano, favorecendo a brotação. Esta metodologia de coleta pode não fornecer resultados fidedignos sobre a variação dos teores de MFA encontrados em *A. pubiflora* ao longo do ano em condições naturais, entretanto, as concentrações de MFA no presente estudo, encontradas em folhas jovens colhidas no mês de dezembro, são semelhantes as encontradas em relatos anteriores avaliadas em novembro em Mato Grosso (Becker et al., 2013). Apesar da semelhança nas concentrações do princípio tóxico, em nosso estudo foram necessários 20g/kg/PV de planta para causar intoxicação fatal, enquanto que Becker et al. (2013) relatam que 1,5 g/kg/PV causaram sinais clínicos de intoxicação em ovinos e 2 g/kg/PV

causaram a morte. Esses dados reforçam o fato anteriormente abordado que a quantidade do princípio tóxico não é o único fator para a ocorrência da intoxicação. Entretanto, até o momento, não é possível explicar quais outros fatores poderiam favorecer a intoxicação neste caso.

Todos os ovinos que manifestaram sinais clínicos, mesmo o ovino que recebeu a planta por maior período de tempo (dezoito dias), morreram de forma súbita e não apresentaram lesões macroscópicas ou histológicas significativas. Relatos anteriores mencionam que, mesmo em animais com evolução crônica, a morte é precedida por uma fase terminal dramática aguda característica de morte súbita (Schons et al., 2011). Por outro lado, lesões macroscópicas e histológicas são descritas em intoxicações crônicas por MFA ou plantas que contêm esse princípio ativo, como *A. sepium*, *A. exotropica* e *A. septentrionalis* (Schultz et al., 1982; Schons et al., 2011; Soares et al., 2011; Albuquerque et al., 2014), mas não na intoxicação por *A. pubiflora*.

Esses resultados demonstram que *A. pubiflora* pode ser tóxica mesmo quando as concentrações de MFA são baixas, evidenciando que a simples presença desta substância é um fator de risco para a ocorrência da intoxicação. Esses dados confirmam a importância não só da identificação do princípio ativo de plantas tóxicas para animais de produção, mas também de sua variação ao longo do ano. O conhecimento do princípio tóxico e suas variações nos permite determinar a patogenia das intoxicações, assim como condições de ocorrência, possíveis tratamentos, controle e profilaxia, contribuindo significativamente para a diminuição de perdas econômicas a campo devido às intoxicações por plantas.

## Referências

- Albuquerque, S.S.C., Rocha, B.P., Almeida, V.M., Oliveira, J.S., Riet-Correa, F., Lee, S.T., Evêncio Neto, J., Mendonça, F.S., 2014. Fibrose cardíaca associada à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(5), 433-437.
- Barbosa, E.F.G., Cardoso, S.P., Cabral Filho, S.L.S., Borges, J.R.J., Lima, E.M.M., Riet-Correa, F., Castro, M.B., 2015. Sinais clínicos e patologia da intoxicação crônica experimental de caprinos por *Palicourea marcgravii*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(3), 209-215.

- Becker, M., Caldeira, F.H.B., Carneiro, F.M., Oliveira, L.P., Tokarnia, C.H., Riet-Correa, F., Lee, S.T., Colodel, E.M., 2013. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos em Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 33 (9), 1049-1056.
- Becker, M., Carneiro, F. M., Oliveira, L. P. D., Silva, M. I. V. D., Riet-Correa, F., Lee, S.T., Colodel, E. M., 2016. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia pubiflora* in sheep with non-toxic doses of the plant and ruminal content. *Cienc Rural*.46, 674-80.
- Duarte, A.L.L., Medeiros, R.M.T., Carvalho, F.K.L., Lee, S.T., Cook, D., Pfister, J.A., Costa, V.M.M., Riet-Correa F., 2013. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia* (Mascagnia) *septrionalis* in goats. *J. Appl. Toxicol.* 34(2), 220-223.
- Kellerman, T. S., Coetzer, J. A.W., Naude, T. W., Botha, C. J. Cardiovascular system. In *Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa*, 2nd ed.; Oxford University Press: Cape Town, South Africa, p 146–153, 2005.
- Krebs, H.C., Kemmerling, W., Habermehl, G., 1994. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-NMR spectroscopy. *Toxicon.* 32, 909-913.
- Lee, S. T., Cook, D., Pfister, J. A., Allen, J. G., Colegate, S. M., Riet-Correa, F., Taylor, C. M., 2014. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. *J Agric Food Chem.* 62, 7345–7354.
- Lee, S.T., Cook, D., Riet-Correa, F., Pfister, J.A., Anderson, W.R., Lima, F.G., Gardner, D.R., 2012. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *amorimia* species. *Toxicon.* 60, 791-796.
- Nogueira, V.A., França, T.N., Peixoto, T.C., Caldas, S.A., Armien, A.G., Peixoto, P.V., 2010. Intoxicação experimental por mono ~ fluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. *Pesq. Vet. Bras.* 30 (7), 533-540.
- Oliveira, M.D., Riet-Correa, F., Carvalho, F.K.L., Silva, G.B., Pereira, W.S., Medeiros, R. M.T., 2013. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6), 731-734.
- Peixoto, T.C., Nogueira, V.A., Coelho, C.D., Veiga, C.C.P., Peixoto, P.V., Brito, M.F., 2010. Avaliações clínico-patológicas e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(12), 1021-1030.
- Pessoa, D.A.N., Silva, L.C.A., Lopes, J.R.G., Macêdo, M.M.S., Garino Junior, F., Azevedo, S.S., Riet-Correa, F., 2015. Resistência à intoxicação por *Amorimia septrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(2), 115-128.
- Santos, A.C., Riet-Correa, F., Heckler, R.F., Lima, S.C., Silva, M.L., Rezende, R., Carvalho, N.M., Lemos, R.A.A., 2014. Administração repetida de doses não tóxicas

de monofluoroacetato de sódio não protege contra a intoxicação por este composto em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7), 649-654.

Schons, S.V., Mello, T.L., Riet-Correa, F., Schild, A.L., 2011. Poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septium* in sheep in northern Brazil. *Toxicon.* 57, 781-786.

Schultz, R.A., Coetzer, J.A., Kellerman, T.S., Naudé T.W., 1982. Observations on the clinical, cardiac and histopathological effects of fluoroacetate in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 49(4), 237-245.

Shokry, E., Santos, F.C., Cunha, P.H.J., Fioravanti, M.C.S., Noronha, A.D.F., Pereira, N.Z., Filho, N.R., 2017. Earwax: A clue to discover fluoroacetate intoxication in cattle. *Toxicon.* 137: 54–57.

Silva, L.C.A, Pessoa, D.A.N, Lopes, J.R.G., Albuquerque, L.G., Silva, L.S.A., Garino Júnior, F., Riet-Correa, F., 2016. Protection against, *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by the continuous administration of sodium monofluoroacetate-degrading bacteria. *Toxicon.* 111, 65-68.

Soares, M.P., Pavarini, S.P., Adrien, M.L., Quevedo, P.S., Schild, A.L., Peixoto, P.V., Farias da Cruz, C.S., Driemeier D., 2011. *Amorimia exotropa* poisoning as a presumptive cause of myocardial fibrosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(6), 1223-1229.

Tokarnia, C.H., Brito, M. de F., Barbosa, J.D., Peixoto, P.V., Dobereiner, J., 2012. *Plantas Tóxicas do Brasil para as Animais de Produção*, second ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro.

## Capítulo 4.

Normalizado segundo Periódico: *Toxicon*

[https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/259?generatepdf=true](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/259?generatepdf=true)

## Intoxicação experimental por *Vernonia rubricaulis* em ovinos

[Experimental poisoning by *Vernonia rubricaulis* in sheep]

Kelly C.S. Godoy <sup>a,\*</sup>, Paula V. Leal <sup>a</sup>, Marcelo A. Araújo <sup>b</sup>, Alda I. Souza <sup>b</sup>, Arnildo Pott <sup>c</sup>, Stephen T. Lee <sup>d</sup>, Claudio S.L. Barros <sup>b</sup>, Ricardo A.A. de Lemos <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil.

<sup>b</sup> FAMEZ, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Botânica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFMS, Cidade Universitária, S/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil

<sup>d</sup> Poisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N., Logan, UT 84341, USA

## Resumo

Para testar a suscetibilidade de ovinos a *V. rubricaulis* e estabelecer os sinais clínicos, achados laboratoriais e patológicos, oito ovinos foram alimentados com doses variadas da planta. O início dos sinais clínicos ocorreu entre 6 e 48 horas após a administração de *V. rubricaulis* e os cursos clínicos duraram de 6 a 56 horas após a ingestão. As atividades séricas de aspartato aminotransferase, gama-glutamil transferase e fosfatase alcalina foram elevadas e os níveis sanguíneos de glicose diminuíram nos ovinos acometidos. Os sinais clínicos consistiam em apatia, anorexia, focinho seco, desconforto respiratório, dor abdominal e fezes pastosas com estrias de sangue e muco. Dois ovinos tinham sinais neurológicos, incluindo fasciculação muscular, nistagmo, movimentos de remo e cegueira. Necrose hepática foi detectada antes da morte por meio de biópsia. Cinco animais morreram e três se recuperaram. O fígado foi acometido em todos os ovinos necropsiados: aumento de volume e acentuação do padrão lobular com áreas vermelhas deprimidas intercaladas com uma rede amarelo pálida. Ascite e hidropericárdio foram achados consistentes. Microscopicamente necrose coagulativa centrolobular a massiva foi observada. Necrose coagulativa também foi observada em alguns túbulos renais proximais. Lesões microscópicas não foram encontradas em nenhum outro órgão. A gravidade das lesões hepáticas foi proporcional ao tamanho da dose. A análise química do carboxiantracilo no material vegetal de *V. rubricaulis* apresentou resultado negativo. Conclui-se que o envenenamento por *V. rubricaulis* em ovinos possui característica clínica, bioquímica e patológica de uma hepatotoxicose aguda.

**Palavras-chave:** Doenças de ovinos, intoxicação por plantas, *Vernonia rubricaulis*, insuficiência hepática aguda, hepatotoxicidade.

## Introdução

A *Vernonia rubricaulis* (família Asteraceae) é um sub-arbusto que causa alta taxas de mortalidade em bovinos da região do Pantanal (Centro-Oeste) do Brasil (Tokarnia e Döbereiner, 1982; Brum et al., 2002). Em um levantamento realizado durante um período de 3 anos em 9 fazendas do estado de Mato Grosso do Sul

(Brum et al., 2002) foram detectadas cerca de 1.000 mortes de bovinos causadas pela ingestão dessa planta. A intoxicação acontece principalmente após o início da estação chuvosa quando ocorre a rebrota da *V. rubricaulis*. Outros fatores também podem favorecer essa rebrota induzindo o desenvolvimento dos brotos que são mais palatáveis para os bovinos. A dose letal para essa espécie é de 10-20 g / kg / peso corporal (pc). O início dos sinais clínicos surge cerca de 24 horas após a ingestão da planta (Tokarnia e Döbereiner, 1982) e o curso clínico varia de 12-48 horas.

A lista de diagnósticos diferenciais deve incluir todos os tóxicos hepáticos agudos (Ricci et al., 2007; Barros, 2016), ao qual o rebanho bovino brasileiro pode ser exposto. A presença da planta, sua distribuição geográfica e sua ecologia, ajudam a definir o diagnóstico específico. Outras Vernônias, como *V. mollissima* (Döbereiner et al. 1976, Tokarnia et al. 1986, Gava et al. 1982) e *Vernonia plantaginoides* (Dutra 2016) foram relatadas como tóxicas para os bovinos.

Até o momento, a intoxicação por *V. rubricaulis* foi documentada apenas em bovinos (Tokarnia e Döbereiner, 1982; Brum et al., 2002), mas existem relatos restritos sobre o envenenamento espontâneo em ovinos. O objetivo deste trabalho foi determinar os sinais clínicos, os dados laboratoriais, as lesões vasculares e histopatológicas e a suscetibilidade dos ovinos a *V. rubricaulis*, para auxiliar profissionais veterinários de campo a diagnosticar esta intoxicação. Uma tentativa em determinar o princípio tóxico da *V. rubricaulis* também foi realizada.

## **Material e métodos**

O experimento foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentos (CEUA) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o protocolo CEUA-UFMS 657/2015.

Oito ovinos, sem raça definida, com idade entre 3-4 anos e peso médio de 40kg foram utilizados no estudo. No início do experimento, foram vermifugados e identificados por números sequenciais de 1- 8 (Tabela 1). Um mês antes do experimento, cada animal foi canulado com uma cânula intraruminal permanente. Durante um período de sete dias, período de adaptação, e ao longo do experimento, os animais foram mantidos dentro de quatro baias de 5x2m (dois animais por baia),



com acesso a água e alimentação correspondente a 2% do seu peso corporal em matéria seca composta por silagem de milho e ração comercial ovina. Um exame clínico era realizado duas vezes ao dia em cada animal.

Para a determinação da atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST), gamma-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (AP), e da concentração de glicose, foram colhidas amostras de sangue dos ovinos antes do início do experimento e vários dias depois.

Brotos frescos de *V. rubricaulis* foram administrados intraruminalmente aos ovinos nas doses de 2, 3, 6 e 12 mg / kg / peso corporal. Para testar um possível efeito acumulativo da planta, um animal (ovino 8) recebeu na dose de 6 mg / kg / pc dividida em 3 doses de 2 mg / kg / pc com intervalos de 24 horas e outro (ovino 6) foi alimentado com 6 mg / kg / pc dividido em 2 doses de 3 mg / kg / pc com intervalo de 24 horas. Todos os outros animais foram alimentados uma única vez com *V. rubricaulis*.

Os ovinos que morreram foram imediatamente necropsiados. O delineamento experimental e os resultados constam na Tabela 1. Foram realizadas biópsias de fígado em todos os animais no dia zero (D0) e em diferentes fases do experimento em três ovinos, nomeadamente ovino 5 (em D0, D4, D7 e D15), ovino 6 (D0 e D2) e Ovino 7 (em D0, D7 e D15 do experimento). A biópsia após D0 não estava disponível nos outros ovinos devido ao curso agudo da doença.

Uma vez que o carboxiatractilosídeos (CAT) está presente em outras plantas que causam hepatotoxicoses com lesão semelhante à encontrada na intoxicação por *V. rubricaulis* (Rissi et al., 2007), uma análise química em busca de uma possível presença de CAT como o princípio tóxico da *V. rubricaulis* foi realizada. Brotos de *V. rubricaulis* foram coletados em 6 de fevereiro de 2017 e 2 de junho de 2017 no município de Campo Grande, MS (S 20°26'34 "W 54 ° 38'47"), submetidos a secagem à temperatura ambiente, triturados e peneirados em uma tela de 2mm.

Amostras de *Xanthium strumarium* foram coletadas em 23 de agosto de 2016 próximo a Benson, Cache County, Utah (N 41° 48 '05 "W) secas à temperatura ambiente. Uma solução de 0,01 µg / mL do padrão de carboxiatractilosídeos de

potássio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi preparado em metanol: água destilada deionizada (50:50 v:v).

O material vegetal das plantas para a análise de carboxiatractilosídeo foi extraído pesando uma amostra da planta triturada (100 mg) dentro de um tubo de ensaio (8ml) com tampas de rosca revestidas com teflon (Pierce, Rockford, IL, EUA). Metanol (2 mL) foi adicionado aos tubos de teste e colocados em agitador mecânico por 16h, então centrifugado para separar o resíduo vegetal e o extrato de metanol. O extrato do metanol (0,5 mL) foi transferido para um frasco automático de amostra de 1,5 mL. Água destilada deionizada (0,5 mL) foi adicionada ao frasco com extrato de metanol e homogeneizado.

Para analisar a *Vernonia rubricaulis* por HPLC-MS (cromatografia líquida de alta eficiência) para identificação do carboxiatractilosídeos, foi injetada uma amostra (10  $\mu$ L) para a coluna analítica de fase reversa Betasil-C18 (100 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) protegida por uma coluna de guarda composta com o mesmo material (10 x 2.1 mm, 5  $\mu$ m) (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EUA).

O carboxiatractilosídeo foi eluído na coluna com fase móvel de 20mM de acetato de amônio acetonitrilo a um fluxo de 0,4 mL /min. A fase móvel foi programada com 20 mM acetato de amônio: acetonitrila, 95:5 v:v durante 1 minuto seguida por um gradiente linear para uma composição de 60:40 v:v 20 mM de acetato de amônio: acetonitrila ao longo de 1 a 8 min. Ao término da fase móvel as amostras foram injetadas usando o sistema HPLC série 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e a coluna eluente foi conectada ao *electrospray ionization* da VELOS PRO LTQ (Thermo Scientific). A análise foi realizada com o espectrômetro de massa operando no modo positivo com os seguintes parâmetros operacionais; temperatura capilar 275°C, temperatura do aquecedor da fonte 300 ° C, fluxo de gás de solvatação 40 l/h, fluxo de gás 5 unidades arbitrárias, voltagem da fonte 3,5 kV, corrente da fonte 100  $\mu$ A a partir de 0-4 min. O excesso de fluxo da coluna foi desviado para descarte, a partir de 4-8 min. o fluxo foi direcionado para a fonte de íons. Foram coletados dados de verificação de massa para uma faixa de 100 a 800 a.m.u. Os cromatogramas reconstruíram íons  $MH^+$ ,  $m/z = 69$ , tempo de eluição de

7,1 min consistentes com o 0,01 µg / mL de carboxiatractilosídeo de potássio que foi utilizado para identificar o carboxiatractilosídeo nas amostras das plantas.

## Resultados

Os resultados laboratoriais constam nas figuras 1-4 e o desenho experimental com os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Delineamento experimental e resultados obtidos.

| Ovinos          | Dose                                  | Início dos sinais clínicos<br>(horas após administração<br>da planta) | Duração do curso<br>clínico (horas) | Desfecho         |
|-----------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| 01              | 12 g/kg/pc                            | 6                                                                     | 6                                   | Morte espontânea |
| 02              | 12 g/kg/pc                            | 8                                                                     | 6                                   | Eutanásia        |
| 03              | 12 g/kg/pc                            | 6                                                                     | 6                                   | Eutanásia        |
| 04              | 6 g/kg/pc                             | 48                                                                    | 14                                  | Morte espontânea |
| 05 <sup>a</sup> | 6 g/kg/pc                             | 48                                                                    | 48                                  | Sobreviveu       |
| 06              | 6 g/kg/pc (duas doses de<br>3g/kg/pc) | 48                                                                    | 56                                  | Eutanásia        |
| 07              | 3 g/kg/pc                             | 48                                                                    | 24                                  | Sobreviveu       |
| 08              | 6 g/kg/pc (três doses de<br>2g/kg/pc) | Sem sinais clínicos                                                   | Sem sinais<br>clínicos              | Sobreviveu       |

<sup>a</sup> administrado brotos mais maduros.

Com exceção do ovino 8, todos os outros ficaram doentes. Os principais sinais clínicos foram a apatia, anorexia, focinho seco, dificuldade respiratória e dor abdominal, também se observou fezes com muco e estrias de sangue em todos os ovinos que adoeceram. Os ovinos 1 e 6 apresentaram sinais nervosos, incluindo fasciculação muscular, nistagmo, movimentos de pedalagem e cegueira.

Houve elevação nas atividades séricas de AST, GGT e FA (Fig. 1-3) nos animais doentes. Os níveis de glicose diminuíram do período pré-experimental de 50 a 80 mg /dL para concentrações entre 1,3-27 mg/dL em cinco ovinos com sinais clínicos (Fig.4).

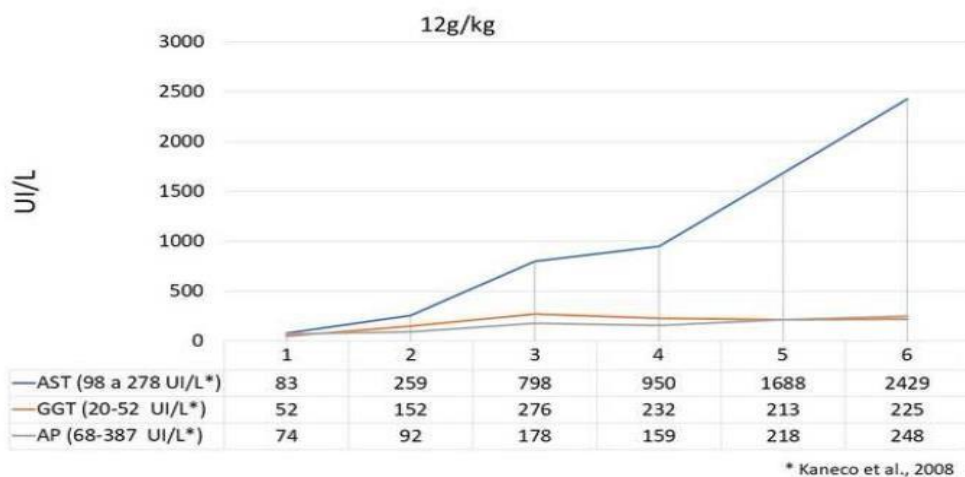


Fig.1. Enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), gamma-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (AP) para três ovinos tratados com 12g / kg / peso corporal dos brotos frescos de *V. rubricaulis* (Kaneco et al., 2008)

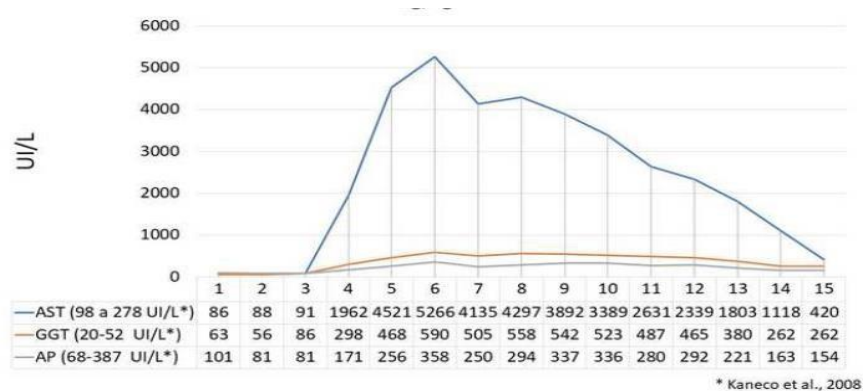


Fig. 2 Valores médios das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), gamma-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (AP) para três ovinos que se intoxicaram consumindo 6 / mg / peso corporal dos brotos frescos de *Vernonia rubricaulis*. Os números expressam UI / L. Os valores das referências estão na linha na parte inferior do gráfico.

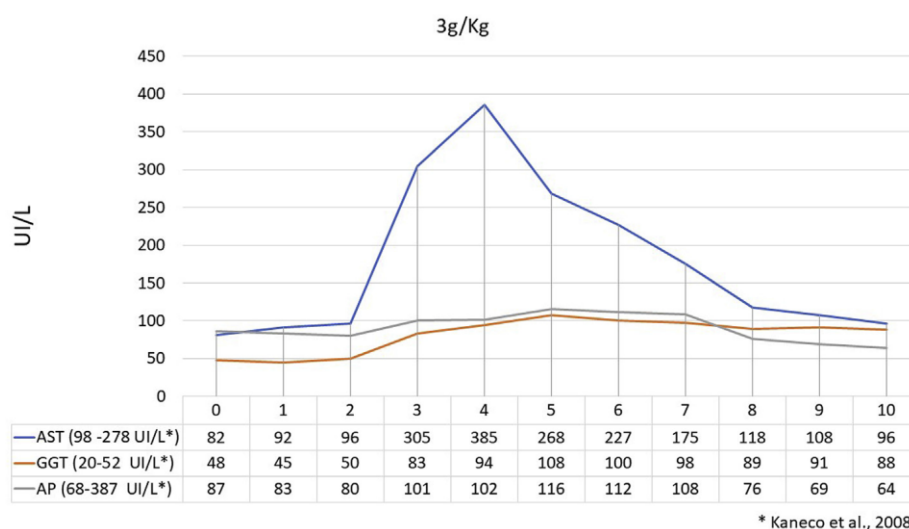


Fig. 3 Gráfico representando valores das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), gammaglutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (AF) para uma ovino afetada alimentada com 3 / mg / peso corporal dos brotos frescos de *Vernonia rubricaulis*. Os números expressam UI / L. Os valores das referências estão na linha na parte inferior do gráfico (Kaneco et al., 2008).

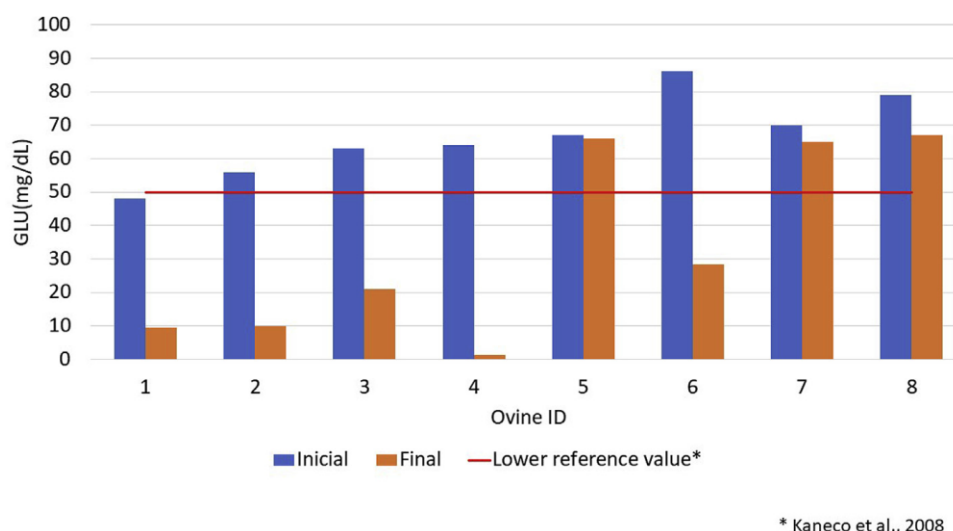


Fig. 4. Valores séricos de glicose dos oito ovinos do experimento nas fases inicial e final do experimento (Kaneco et al., 2008).

Cinco ovinos morreram e três se recuperaram. Os animais 2 e 3 devido ao mau prognóstico foram eutanasiados. Lesões hepáticas constituídas por necrose coagulativa centrolobular foram detectadas nos ovinos 5 em D4-D7 e no ovino 6 em D2 do experimento. O Ovino 6 morreu no D3. As subsequentes biópsias do ovino 5 revelaram que as lesões diminuíram até D15, quando o ovino se recuperou

cl clinicamente e as enzimas hepáticas retornaram aos valores normais. O D4 do ovino 5 coincidiu com a elevação das enzimas hepáticas.

As lesões macroscópicas consistiram em equimoses e petéquias nas membranas serosas, principalmente do epicárdio. A vesícula biliar estava distendida e edematosa. O fígado de todos os ovinos necropsiados foi acometido. Aumento de volume e marcada acentuação do padrão lobular com áreas vermelhas deprimidas intercaladas com regiões amarelo pálido (Fig. 5) foram achados consistentes. Microscopicamente foi observada necrose coagulativa centrolobular massiva (Fig. 6). Em alguns casos, áreas necróticas hemorrágicas confluentes formando pontes de necrose. A necrose coagulativa também foi observada no rim em alguns túbulos contorcidos proximais. Não foram encontradas lesões microscópicas em outros órgãos de nenhum animal. A gravidade das lesões hepáticas foi proporcional ao tamanho da dose.

O carboxiatractilosídeo foi detectado em 0,01 µg / mL de carboxiatractilosídeo de potássio em 5X a S/N. O carboxiatractilosídeo estava presente nas sementes *X. strumarium*, mas não foi detectado na amostra da planta *V. rubricaulis*.

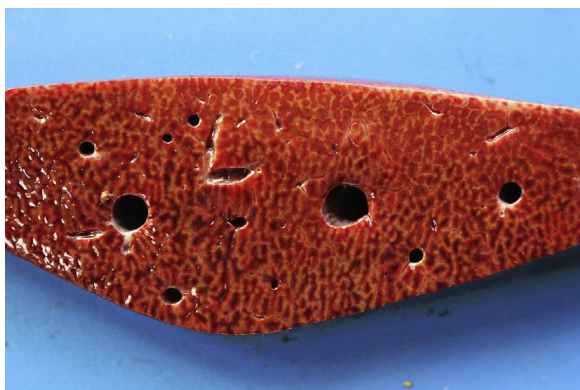


Fig. 5. Intoxicação experimental por *Vernonia rubricaulis* em ovinos. A acentuação do padrão lobular apreciada na superfície cortada, onde as áreas vermelhas e deprimidas aparecem intercaladas com redes amarelo pálido.

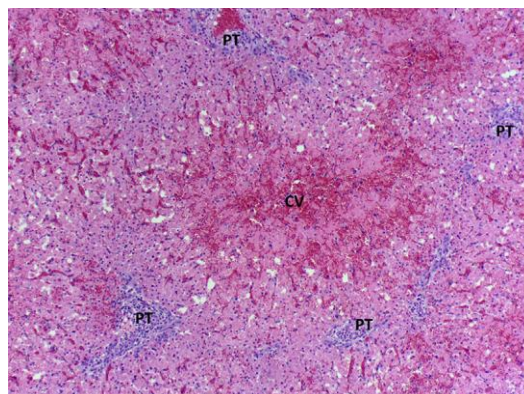


Fig. 6. Intoxicações experimental por *Vernonia rubricaulis* em ovinos. O aspecto microscópico do fígado. Necrose coagulativa massiva é observada no centro do lóbulo. CV = veia centrolobular; PT = tríade do portal.

## Discussão

A administração experimental de doses de 6-12/ g/kg/pc de *V. rubricaulis* para ovinos resultou em doença hepatotóxica letal. As lesões hepáticas observadas nos

ovinos deste experimento são típicas daqueles derivados da ação de tóxicos de ação aguda que causam insuficiência hepática. A doença do fígado nos casos do experimento atual é indicada por uma marcada elevação nas atividades séricas de enzimas hepáticas. Várias toxinas de plantas, bactérias, fungos, insetos e drogas podem causar semelhantes lesões e sinais clínicos em animais domésticos (Rissi et al., 2007, Tessele et al., 2012, Barros, 2016). Por razões evidentes, plantas tóxicas são a principal causa desse tipo de lesão em herbívoros.

O diagnóstico de uma hepatotoxicose aguda nos casos experimentais foi realizado com base no padrão de lesão hepática (centrolobular e necrose coagulativa submassiva) que é característico deste tipo de lesão em ruminantes e foram vistos tanto em biópsias quanto em espécimes de necropsia e elevação de enzimas de lesão hepática.

A identificação química das hepatotoxinas contidas na *V. rubricaulis* ainda não foi determinada. No entanto, sua ação é semelhante à de outras toxinas agudas, principalmente fitotoxinas que são reconhecidas como causa de insuficiência hepática aguda em animais de produção. A necrose centrolobular aguda como observada nos casos atuais não é específico para nenhuma dessas hepatotoxinas agudas, mas ocorre de forma semelhante a todas as hepatotoxinas (Ricci et al. 2007, Barros, 2016). Sucintamente, hepatotoxinas que passam pela biotransformação tende a exercer seu efeito em hepatócitos de Zona 3 - o centro do lóbulo (Barros 2016). O motivo pelo qual o centro do lóbulo é mais vulnerável a um insulto tóxico comparado aos hepatócitos localizados periféricamente (Zona 1) é que, aparentemente, os hepatócitos nesta região têm enzimas mais abundantes que transformam os compostos lipossolúveis em substâncias tóxicas e porque os hepatócitos centrolobulares têm níveis mais baixos de oxigênio e glutathione peroxidase (Barros 2016). Nas hepatotoxinas que não precisam de biotransformação para exercer seus danos - a chamada "ação direta" das hepatotoxinas - tendem a atuar em hepatócitos da periferia lobular (zona 1) devido à proximidade desses hepatócitos periportais com o sangue que transporta a toxina e chegando em ramos da veia porta e da artéria hepática (Barros, 2016).

É preciso diferenciar as denominações dadas a estas lesões hepáticas agudas como - centrolobular, centrolobular a mediozonal e massiva – na realidade significa apenas o grau de severidade da lesão dependente da dose. Por exemplo, uma dose maior de *V. rubricaulis* causa necrose hepática massiva enquanto doses menores causam necrose restrita às áreas centrolobulares do lóbulo (necrose centrolobular). Esse foi o caso dos ovinos deste experimento. Além disso, "centrolobular a mediozonal " é uma expressão errônea, uma vez que a região mediozonal é uma faixa de necrose hepatocelular restrita à área mediozonal (zona 2) do fígado, não afetando a área centrolobular e raramente descrita em animais (Brown et al., 2017).

Os ovinos deste experimento apresentavam sinais neurológicos claramente observáveis, incluindo incoordenação e opistótono. Sinais neurológicos associados com lesão hepática aguda estão relacionadas à encefalopatia hepática. No entanto, em nenhum cérebro as lesões foram detectadas microscopicamente. Geralmente, as lesões de encefalopatia hepática em ruminantes são observadas em animais que morrem por insuficiência hepática crônica. Eles consistem de vacúolos ovais ou alongados, cinco a 40 mm de diâmetro, localizados principalmente na interface da substância branco-cinza. Esses vacúolos são resultantes de edema intramielínicos (Barros et al., 2006).

Recentemente, as alterações nos astrócitos, como a transformação de Alzheimer do tipo II, foram descritos em associação com insuficiência hepática aguda em bovinos (Wouters et al., 2017). Não se detectou lesões semelhantes no cérebro dos ovinos deste estudo. Os ovinos acometidos na intoxicação experimental também desenvolveram hipoglicemia, e isso poderia explicar a sinais neurológicos. No entanto, o dano cerebral hipoglicêmico causa necrose de neurônio (neurônios vermelhos) geralmente envolvendo córtex cerebral, hipocampo e o núcleo caudado (Vinters e Kleinschmidt-Demasters, 2008), essas lesões estavam ausentes nos cérebros destes ovinos.

Sinais clínicos, achados macroscópicos e histopatológicos no ovino do experimento atual foi semelhante aos relatados na intoxicação por *X. strumarium*, por isso amostras de *V. rubricaulis* foram analisadas por HPLC-MS para identificar a presença de carboxiatractilosídeo, reportado em intoxicação *X. strumarium* (Cole et



al 1980, Rissi et al. 2007). Enquanto o carboxiatractilosídeo foi detectado na amostra de *X. strumarium*, nas amostras de *V. rubricaulis* não foi detectado. Isso exclui carboxiatractilosídeo como o princípio tóxico da *V. rubricaulis*. Assim, o princípio hepatotóxico da *V. rubricaulis* permanece desconhecido. Diversas substâncias citotóxicas foram isoladas de outras espécies de *Vernonia* (Ndhlala et al., 2013, Toyang e Verpoorte 2013). Estas incluem lactonas sesquiterpênicas da *V. nudiflora* e *V. mollissima*. (Babalola et al., 2001, Catalan et al., 1986), mas somente um número limitado de princípios com atividade tóxica foram avaliados e o responsável pelo efeito não identificado. A hepatotoxicidade causada por extratos de *V. amygdalina* foi relatada em camundongos (Ndhlala et al. 2013) e por *V. colorata* em ratos (Ijeh e Onyechi 2010). Paradoxalmente, a fração terpenoide de *Vernonia* spp. parece proteger os ratos da hepatotoxicidade do acetaminofeno e do tetracloreto de carbono (Babalola et al. 2001, Ekam et al 2012), embora as enzimas hepáticas aumentem com o tempo (Ojiako e Nwanjo 2006), isso parece indicar que, quando consumida grandes quantidades de *Vernonia*, as plantas podem causar lesões hepáticas. Medidas para controlar a planta são difíceis de aplicar. Áreas onde grandes quantidades de *Vernonia* spp. existem devem ser isolados durante ou logo após a estação chuvosa.

## Referências

- Babalola, O.O., Anetor, J.I., Adeniyi, F.A., 2001. Amelioration of carbon tetrachloride - induced hepatotoxicity by terpenoid extract from leaves of *Vernonia amygdalina*. Afr. J. Med. Med. Sci. 30, 91-93.
- Barros, C.S.L., Driemeier, D., Dutra, I.S., Lemos R.A.A., 2006. Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil: Coleção Vallée. AGNS, São Paulo. P.207.
- Barros, C.S.L., 2016. Tóxicos exógenos com ação sobre o fígado. In: Santos, R.L., Alessi, A.C. (Eds.), Patologia Veterinária, second ed. São Paulo, Roca, pp.249-261.
- Brown, D.L, Wettter, A.J.V., Cullen, J.M., 2017. Necrosis and apoptosis, 421-461. In: Zachary J.F. (Ed.) Pathologic Basis of Veterinary Disease, sixth ed. St Louis, Elsevier.

- Brum, K.B., Purisco, E., Lemos, R.A., Riet-Correa, F., 2002. Intoxication by *Vernonia rubricaulis* in cattle in Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 22, 119-128.
- Catalan, C.A., Iglesias, D.I., Kavka, J., Sosa, V.E., Herz, W., 1986. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Vernonia mollissima* and *Vernonia squamulosa*. *J. Nat. Prod.* 49, 351–353.
- Cole, R.J., Stuart, B.P., Lansden, J.A., Cox, R.H., 1980. Isolation and redefinition of the toxic agent from cocklebur (*Xanthium strumarium*). *J. Agric. Food Chem.* 28, 1330-1332.
- Döbereiner, J., Tokarnia, C.H., Purisco, E., 1976. *Vernonia mollissima*, planta tóxica responsável por mortandades de bovinos no sul de Mato Grosso. *Pesq. Agropec. Bras.* 11, 49-58.
- Dutra, F., Romero, A., Quinteros, C., Araújo, R., 2016. Poisoning of sheep by *Vernonia plantaginoides* (Less.) Hieron in Uruguay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 28, 392-398.
- Ekam, V.S., Johnson, J.T., Dasofunjo, K., Odey, M.O, Anyahara, S.E., 2012. Total protein, albumin and globulin levels following the administration of activity directed fractions of *Vernonia amygdalina* during acetaminophen induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Ann. Biol Res.* 3, 5590–5594.
- Gava, A., Peixoto, P.V., Tokarnia, C.H., 1987. Intoxicação experimental por *Vernonia mollissima* (Compositae) em ovinos e bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 7, 33-41.
- Ijeh, I.I., Onyechi, O., 2010. Biochemical and histopathological changes in liver of albino rats fed diets incorporated with *Vernonia amygdalina* and *Vernonia colorata* leaves. *Int. J. Med. Med. Sc.* 2, 285–289.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, sixth ed. Academic Press, San Diego, pp. 882-884.
- Ndhlala, A.R., Ncube, B., Okem, A., Mulaudzi, R.B., Van Staden, J., 2013. Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. *Food Chem. Toxicol.* 62, 609-621.
- Ojiako, O.A., Nwanjo, H.U., 2006. Is *Vernonia amygdalina* hepatotoxic or hepatoprotective? Response from biochemical and toxicity studies in rats. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 1648–1651.

- Rissi, D.R., Driemeier, D., Silva, M.C., Barros, R.R., Barros C.S.L., 2007. Poisonous plants producing acute hepatic disease in Brazilian cattle, 72-76. In: Panter, K.E., Wierenga, T.L., Pfister, J.A. (Eds), Poisonous Plants: Global research and solutions. CAB International, Wallingford, UK.
- Tessele, B., Brum, J.S., Schild, A.L., Soares, M.P., Barros, C.S., 2012. Sawfly larval poisoning in cattle: Report on new outbreaks and brief review of the literature. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 1095–1102.
- Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., Amorim, P.R., Gava, A., Consorte, L.B., 1986. Intoxicação experimental por *Vernonia mollissima* (Compositae) em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 6, 5-10.
- Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., 1982. Intoxicação de bovinos por *Vernonia rubricaulis* (Compositae) em Mato Grosso. *Pesq. Vet. Bras.* 2, 143-147.
- Toyang, N.J., Verpoorte, R., 2013. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 146, 681–723.
- Vinters, H.V., Kleinschmidt-Demasters, B.K., 2008. Hypoglycemic brain damage, 99-103. In: Love S. et al. (Eds.) *Greenfield's Neuropathology*. Eighth ed..Hodder Arnold, London.
- Wouters, A.T.B., Wouters, F., Boabaid, F.M., Watanabe, T.T.N., Fredo, G., Varaschin, M.S., Driemeier, D., 2017. Brain lesions associated with acute toxic hepatopathy in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29, 287-292.

## Anexos:

Artigo publicado: Intoxicação experimental por *Vernonia rubricaulis* em ovinos



## Experimental poisoning by *Vernonia rubricaulis* in sheep



Kelly C.S. Godoy<sup>a,\*</sup>, Paula V. Leal<sup>a</sup>, Marcelo A. Araújo<sup>b</sup>, Alda I. Souza<sup>b</sup>, Arnildo Pott<sup>c</sup>, Stephen T. Lee<sup>d</sup>, Claudio S.L. Barros<sup>b</sup>, Ricardo A.A. de Lemos<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Felinto Müller, 2443, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil

<sup>b</sup> FAMEZ, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Botânica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFMS, Cidade Universitária, S/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil

<sup>d</sup> Poisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N, Logan, UT 84341, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 August 2017

Received in revised form

6 November 2017

Accepted 7 November 2017

Available online 8 November 2017

#### Keywords:

Sheep diseases

Poisonous plants

*Vernonia rubricaulis*

Acute liver failure

Hepatotoxicity

### ABSTRACT

In order to evaluate the susceptibility of sheep to *V. rubricaulis* and to establish the clinical signs, serum biochemistry, and pathological findings, eight sheep were fed varying doses of *V. rubricaulis*. The onset of clinical signs occurred 6–48 h after the ingestion of *V. rubricaulis*. Clinical courses lasted 6–56 h after the ingestion of the plant. Serum activities of aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transferase, and alkaline phosphatase were highly elevated and glucose blood levels were low in affected sheep. Clinical signs consisted of apathy, anorexia, dry muzzle, respiratory distress, abdominal pain, and mushy feces with streaks of blood and mucus. Two sheep had neurological signs including muscle fasciculation, nystagmus, paddling movements, and blindness. Liver necrosis could be detected antemortem through liver biopsy. Five sheep died and three recovered. The liver was affected in all necropsied sheep; it increased in volume and had marked accentuation of the lobular pattern with red, depressed areas intercalated with a pale yellow network. Ascites and hydropericardium were consistent findings. Microscopically, centrilobular to massive coagulative necrosis was observed. Coagulative necrosis was also observed in a few proximal renal tubules. Microscopic lesions were not found in any other organs. The severity of liver lesions was proportional to the dose. Chemical analysis to detect carboxyatractylolide in *V. rubricaulis* plant material was negative. It is concluded that *V. rubricaulis* poisoning in sheep is clinically, biochemically, and pathologically characteristic of an acute hepatotoxicosis.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Vernonia rubricaulis* (family Asteraceae) is a shrub that causes high mortality rates in cattle from the Pantanal (Midwest) region of Brazil (Tokamia and Döbereiner, 1982; Brum et al., 2002). In a survey during a 3-year-period carried out in 9 farms of the State of Mato Grosso do Sul (Brum et al., 2002) approximately 1000 cattle deaths caused by the ingestion of *V. rubricaulis* were reported. In general, the poisonings occurred after the beginning of the rainy season when plant growth begins. Other factors also might favor

been reported to be about 24 h after the ingestion of the plant and the clinical course ranges from 12 to 48 h (Tokamia and Döbereiner, 1982).

The list of differential diagnosis should include all the other acute hepatic toxicants (Rissi et al., 2007; Barros, 2016) to which Brazilian cattle might be exposed. The presence of the plant, its geographic distribution and its ecology, help to define the specific diagnosis. Other *Vernonia*, such as *V. mollissima* (Döbereiner et al., 1976; Tokamia et al., 1986; Gava et al., 1987) and *Vernonia plantaginoides* (Dutra et al., 2016) have been reported as toxic for



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado "Modelo experimental para validação de indicadores de lesão cardiotoxicas aguda e crônicas em ovinos", Protocolo nº 707/2015 sob a responsabilidade de **Ricardo Antônio Amaral de Lemos** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em reunião ordinária do dia 09 de setembro de 2015.

|                          |                                       |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Vigência do Projeto      | 01/11/2015 a 01/11/2017               |
| Espécie/Linhagem ou Raça | <i>Ovis aries</i> / Sem Raça Definida |
| Números de Animais       | 10                                    |
| Peso/Idade               | 30 – 50 kg / 2 anos                   |
| Sexo                     | Macho e Fêmea                         |
| Origem (fornecedor)      | FAMEZ/UFMS                            |

*Maria Araújo Teixeira*  
**Maria Araújo Teixeira**

Coordenadora da CEUA/UFMS  
Campo Grande, 11 setembro de 2015.

**Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação- PROPP**  
Cidade Universitária, s/n | Caixa Postal 549  
Fone: 67 3345.7186 E-mail: gab.propp@ufms.br  
CEP 79070-900 | Campo Grande | MS





Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 657/2015 do Pesquisador **Ricardo Antônio Amaral de Lemos**, referente ao projeto de pesquisa "Potencial forrageiro de plantas tóxicas de interesse pecuário em Mato Grosso do Sul", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 27 de fevereiro de 2015.

Joice Stein

Vice-coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 27 de fevereiro de 2015.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA  
<http://www.propp.ufms.br/ceua>  
[ceua.2000@gmail.com](mailto:ceua.2000@gmail.com)  
fone (67) 3345-7186



Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



**Ata de Defesa de Tese**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**  
**Doutorado**

Aos vinte e quatro dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezoito, às oito horas, na sala F da Pós-Graduação da FAMEZ, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reunia-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Ricardo Antonio Amaral de Lemos (UFMS), Carlos Eurico dos Santos Fernandes (UFMS), Claudio Severo Lombardo de Barros (UFMS), Danilo Carlotto Gomes (UFMS) e Flavia Barbieri Bacha (UNIGRAN), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **KELLY CRISTINA DA SILVA GODOY**, CPF 00370369122, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**MODELO EXPERIMENTAL PARA VALIDAÇÃO DE INDICADORES DE LESÃO CARDIOTÓXICAS AGUDA E CRÔNICA EM OVINOS**" e orientação de Ricardo Antonio Amaral de Lemos. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

| EXAMINADOR                                  | ASSINATURA | AValiação |
|---------------------------------------------|------------|-----------|
| Dr. Ricardo Antonio Amaral de Lemos         |            | Aprovada  |
| Dra. Flavia Barbieri Bacha (Externo)        |            | Aprovada  |
| Dr. Danilo Carlotto Gomes                   |            | Aprovada  |
| Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes      |            | Aprovada  |
| Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros       |            | Aprovada  |
| Dra. Cassia Rejane Leal de Brito (Suplente) |            |           |
| Dra. Karine Bonucelli Bram (Suplente)       |            |           |

**RESULTADO FINAL:**

☒ Aprovação ☐ Aprovação com revisão ☐ Reprivação

**OBSERVAÇÕES:**

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna