

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



MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE PLANTAS TÓXICAS E DETERMINAÇÃO DA ETIOPATOGENIA DE MORTALIDADES EM BOVINOS COM CAUSAS NÃO DETERMINADAS

PAULA VELOZO LEAL

Campo Grande - MS 2018

PAULA VELOZO LEAL

MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE PLANTAS TÓXICAS E DETERMINAÇÃO DA ETIOPATOGENIA DE MORTALIDADES EM BOVINOS COM CAUSAS NÃO DETERMINADAS

EXPERIMENTAL MODELS FOR THE STUDY OF ACTIVE
PRINCIPLES OF TOXIC PLANTS AND DETERMINATION OF THE
ETIOPATHOGENY OF MORTALITIES IN CATTLE WITH
UNDETERMINED CAUSES

PAULA VELOZO LEAL ORIENTADOR: RICARDO ANTÔNIO AMARAL DE LEMOS

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

CAMPO GRANDE, MS 2018

Dodice este trabalho a minha Mão Maria Zália, ou malhar, min	ha voia la ala
Dedico este trabalho a minha Mãe Maria Zélia, ou melhor, min gostaria de agradecer pois é maior exemplo de honestidade, pe	
amor que já tive nessa vida. A base da nossa família, que se absteve	
sonhos por nossa família e segura todas as barras para podermos a no	ssos sonhos!

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e toda a fé que me fez seguir em frente com todos os percalços do caminho.

A todos os animais envolvidos no meu experimento, por mais controverso que nossas pesquisas possam parecer, tudo foi feito com muito amor e respeito, a cada animal dedito todos os frutos da minha produção acadêmica e do meu crecimento como pessoa, em respeitar e amar todas as criaturas filhas de Deus.

Aos meus pais e meus irmãos Thiago, Emmanuel e Laura que aguentam meus estresses, que não são poucos, desde sempre e mesmo assim ainda me amam!

Ao Victor por toda disponibilidade e companheirismo, pois não seria qualquer pessoa que aceitaria virar as madrugadas fazendo necropsia, mesmo sendo engenheiro civil, para que pudesse realizar os experimentos ao mesmo tempo em que comecei a dar aulas. Sem esse apoio o caminho com toda certeza seria mais difícil.

Ao Professor Ricardo, que acreditou em mim e me deu todas oportunidades de seguir na carreira que sempre sonhei, apoiou minhas loucuras, me ensinou acima de tudo como a humildade é a melhor forma de ser exemplo aos outros. Obrigada por sempre, me ouvir, me apoiar e acreditar que as coisas dariam certo.

Ao professor Claudio Barros, por todo auxilio desde a residência e que nunca mediu esforços para que meus projetos dessem certo, além disso esta sempre pronto para ajudar-me em todas as coisas que precisei.

A minha amiga e irmã de alma Rayane que como nunca esteve do meu lado em todos os perrengues desde o estagio de graduação, residência, mestrado e doutorado. Muitos quilômetros viajados juntas, nem sei quantas necropsias e muito menos quantas furadas, mas temos muitas histórias para levarmos para uma vida toda.

A Juliana, Kelly e Stephanie que sempre estiveram comigo e principalmente escutaram minhas lamúrias e me apoiaram em tudo, todo amor a vocês por tudo que fizeram pra mim.

A equipe do laboratório de anatomia patológica, os Professores Danilo e Professora Tessie por todo ensinamento, aos residentes que passaram por essa etapa, Marcus, Alexandre, Amanda e Carol, que sempre ajudaram em tudo que foi preciso, além de renderem boas risadas.

A Nickolly, não só por estar sempre pronta a me ajudar com os materiais do experimento, mas também por me ensinar tudo sobre processamento e muito mais importante por servir de refúgio e de ombro amigo nas horas de aperto.

Ao Gerson, que com muito carinho sempre foi prestativo e nunca mediu esforços para me ajudar. Ao Jhonnie por toda prestesa.

A equipe da clinica de grandes animais da UFMS, em especial ao Marcelo, por sempre nos ajudar prontamente, ser um grande amigo e torcer por todas nossas conquistas.

A equipe do laboratório de Patologia Clínica da UFMS por realizar prontamente os exames e sempre estarem disponíveis quando precisei de ajuda, principalmente a professora Alda por sempre estar disponível a me prestar auxilio e aconselhar.

Aos Secretários da pós Fernado e Ricardo, sempre prontos para resolver nossas burocracias e que possibilitaram que tudo corresse bem durante o curso de mestrado e doutorado.

A equipe do Lapex, que me acolheu neste ano de docência e me abriu os olhos para novos horizontes de ensino e pesquisa. As meninas (Sandy, Tay, Liliam, Karine, Duda, Bruna, Sabrina, Brenda) pelos almoços, pelas risadas pelas sessões de terapia coletiva e por todo carinho.

Ao Carlos e a Karine por me acolherem no espaço que era deles e por darem todo apoio na atividade de docência, e permitirem que eu descobrisse o amor que tenho em ensinar.

Agradeço aos meus amigos e famíliares por entender e apoiar minha ausência em muitos momentos, e agora poderemos com mais calma aproveitarmos juntos esta nova fase da vida.

Sumário

RESUMO	. 11
ABSTRACT	. 13
CAPÍTULO 1	. 14
1. INTRODUÇÃO	. 14
2. OBJETIVOS	. 16
2.1. Objetivo Geral	. 16
2.2. Objetivos Específicos	. 16
3. REVISÃO DA LITERATURA	. 17
3.1 INTOXICAÇÃO POR OXALATO	. 17
3.2 INTOXICAÇÃO POR Vernonia rubricaulis	. 23
3.3 Intoxicação por <i>Crotalaria</i> sp	. 27
5. REFERÊNCIAS:	. 28
CAPÍTULO 2 - ARTIGO – INTOXICAÇÃO POR OXALATO DE AMÔNIA	EM
OVINOS	. 34
1.1 Introdução	. 35
1.2 Materiais e métodos	. 35
1.3 Resultados	. 36
1.4 Discussão	. 37
Agradecimentos:	. 38
1.5 Referências:	. 38
1.6 QUADRO	. 39
1.7 FIGURAS	. 40
CAPÍTULO 3 - ARTIGO – INTOXICAÇÃO POR <i>Vernonia rubricaulis</i> OVINOS	
Experimental poisoning by Vernonia rubricaulis in sheep	. 44

dPoisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service
Inited States Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N., Logan, UT 84341, US
4
ABSTRACT4
1. Introduction 4
2. Material and Methods 4
3. Results4
4. Discussion4
Acknowledgments5
5. References5
LEGEND FOR THE FIGURES5
CAPÍTULO 4 - ARTIGO - Encefalopatia hepática secundária a lesõe
hepáticas crônicas causadas por Crotalaria incana em bovino 5
RELATO DE CASO5
Hepatic Encephalopathy Secondary to Chronic Liver Lesions Caused b
Crotalaria incana in a Bovine5
ABSTRACT6
INTRODUCTION6
CASE6
DISCUSSION6
MANUFACTURERS6
LEGENDA PARA AS FIGURAS6
ANEXOS7
PROJETO APROVADO7
7
4. METODOLOGIA
5. ATIVIDADES E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO 9
6 RESULTADOS ESPERADOS PRODUTOS E AVANCOS

7. IM	IPACTOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS PARA MATO GROSSO	DO
SUL		94
8.REI	FERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
AUTO	ORIZAÇÕES LEGAIS1	101
CEUA	A – UFMS – 884/2017 – ARTIGO 1 1	101
CEUA	A – UFMS - 657/2015 ARTIGO 2 VERNONIA	102
Norm	nas Revistas 1	102
1)	Suplemento Pesquisa Veterinária Brasileira – ENDIVET 2018 1	102
2)	Normas Acta Veterinaria	105

LISTA DE TABELAS							
Quadro 1 Artigo 1.	ental por oxalato	r oxalato em ovinos. Delineamento			39		
	experimental	е	progressão	dos	sinais	clínicos	
Tabela 1. Artigo 2	Experimental de	esign	and results				58

	LISTA DE FIGURAS	
	INTOXICAÇÃO POR OXALATO DE AMÔNIA EM OVINOS	
Figura 1	A) Rúmen e retículo, hiperemia acentuada difusa da mucosa ruminal e	
	discreta da mucosa reticular. B) Abomaso, hiperemia e edema	40
	acentuado, mais evidente nos ápices das pregas abomasais	
Figura 2	Rim. Corte transversal evidenciando a divisão corticomedular renal (seta)	40
Fig. 3.	Rúmen. Vacuolização citoplasmática das células epiteliais ruminais com	
	citoplasma repleto de cristais de oxalato (setas) em 0h (A e B) e 12 h (C e D).	41
Figura 4	Rim. A) corte de rim fixado no momento da necropsia, apresenta múltiplos	
	túbulos degenerados e presença moderada a acentuada de cristais	
	aciculiformes esverdeados preenchendo o seu lúmen. HE. Obj.40x. B)	44
	corte de rim fixado 12 horas após a necropsia, há evidente alteração na	41
	eosinofilia dos túbulos, e diminuição acentuada dos cristais intraluminais.	
	HE. Obj. 40x.	
	INTOXICAÇÃO POR Vernonia rubricaulis EM OVINOS	
Fig.1.	Graph representing the average values of the liver enzymes aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and alkaline phosphatase (AP) for three affected sheep fed 12 g/kg/body weight of the fresh sprouts of Vernonia rubricaulis. Numbers express UI/L. The reference values are in the line at the bottom of the	55
Fig. 2	graph	56
Fig. 3 Fig. 4	Graph representing values of the liver enzymes aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and alkaline phosphatase (AF) for one affected sheep fed 3 g/kg/body weight of the fresh sprouts of Vernonia rubricaulis. Numbers express UI/L. The reference values are in the line at the bottom of the graph Graph representing the blood glucose values in the eight sheep of the	56
J	experiment in the start and final phases of the	57
	experiment	01
F: F	Experimental poisoning by Vernonia rubricaulis in sheep. Liver from	
Fig. 5	Experimental poisoning by vernonia rubricadiis in sheep. Livel nom	57

	appreciated at the cut surface where red, depressed areas appear intercalated with a pale-yellow etwork					
Fig. 6	Experimental poisoning by <i>Vernonia rubricaulis</i> in sheep. The microscopic					
	aspect of the liver. Massive coagulative necrosis is observed at the center	58				
	of the lobule. CV =centrilobular vein; PT = portal triad					
ENCEFA	LOPATIA HEPÁTICA SECUNDÁRIA A LESÕES HEPÁTICAS CRÔN	ICAS				
	CAUSADAS POR Crotalaria incana EM BOVINO					
Figura 1.	Flowering specimen of C. incana found in Property 1	71				
Figura 2.	The major pyrrolizidine alkaloids identified in Crotalaria incana of this	72				
	study were usaramine and usaramine N-oxide					
Figura 3	Cut surface of the liver mottled with dark red parenchyma intercalated by	72				
	extensive orange colored and markedly firm áreas	12				
Figura 4	Figure 4 Extensive hepatic fibrosis	73				
Figura 5	The hepatocytes (top left) are vacuolated (hepatic degeneration). Notice	73				
	the extensive cholestasis	73				
Figura 6	Brain, vacuolation of myelin sheaths (status spongiosus). This lesion was					
	mainly found in the brain stem and at the junction of the cerebral grey	74				
	matter and subcortical white matter of the frontal, parietal and occipital	, 4				
	telencephalon, and basal ganglia					

1 RESUMO

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

LEAL, P.V. Modelos experimentais para o estudo de princípios ativos de plantas tóxicas e determinação da etiopatogenia de mortalidades em bovinos com causas não determinadas. 2018. 109p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

Prejuízos econômicos provocados por doenças são fatores limitantes para a atividade pecuária de bovinos, apesar do impacto econômico gerado por estas doenças, um elevado número de casos encaminhados para os servicos de diagnóstico permanece sem a determinação da causa morte. Em relação as plantas tóxicas, apesar dos avanços na determinação do diagnóstico, da epidemiologia e quadro clínico patológico desencadeado pelas intoxicações, o conhecimento sobre os princípios tóxicos da maioria destas plantas ainda é limitado. A principal dificuldade para a identificação do princípio tóxico é determinar dentre os vários constituintes químicos da planta qual ou quais são os responsáveis pelo quadro clínico patológico. O objetivo da presente tese foi estudar os quadros tóxicos que ocorrem no estado do Mato Grosso do Sul, mas que não possuem quadro clínico patológico e princípios químicos completamente elucidados. Deste modo pretende-se desenvolver modelos experimentais para o estudo de princípios ativos de plantas tóxicas e determinação da etiopatogenia de mortalidades em bovinos com causas não determinadas. Os estudos desenvolvidos geraram três artigos que obtiveram como resultados: Artigo 1 teve como objetivo reproduzir a intoxicação aguda por oxalato de amônia em ovinos e verificar se as lesões observadas e os cristais de oxalato permanecem desde de o momento da morte até o momento da coleta o material para exame histológico. O experimento foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética Comitê de Uso Animal em Experimentos (CEUA) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o protocolo CEUA-UFMS 884/2017. Foram utilizados cinco ovinos, hígidos, provenientes de áreas sem a ocorrência da intoxicação por oxalato, sem raça definida, machos e fêmeas com seis a 48 meses de idade e pesos entre 20 e 35 kg. Os animais receberam, por via oral, através de seringa e misturado junto ao concentrado, oxalato de amônia, nas doses de 1,5g/kg/PV ou 0,5g/kg/PV. Com os resultados concluiu-se que a presença de cristais na mucosa do rúmen e em túbulos renais foi um achado constante na intoxicação por oxalatos e pode ser usado como critério para o diagnóstico desta intoxicação. A redução da observação dos mesmos em função do tempo decorrido após a morte dos ovinos, indica que este é um fator importante a ser considerado para excluir esta intoxicação quando os cristais não são observados.; Artigo 2 - 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. Ascite e hidropericárdio foram achados consistentes. Microscopicamente necrose coagulativa centrolobular a massiva foi observada. Necrose coagulativa também foi observada em alguns túbulos renais proximais. A gravidade das lesões hepáticas foi proporcional a dose. A análise química do carboxiantractilo 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 hepatoxicose aguda; Artigo 3 - A intoxicação por *C. incana* em bovinos é raramente documentada. Portanto relatou-se os sinais clínicos e achados patológicos de um caso de intoxicação por C. incana em bovinos e o achado químico de um potencial desidropirrolizidina tóxica na planta. Os achados de necropsia significativos foram limitados ao fígado, que estava marcadamente aumentado e com bordas arredondadas. A superfície do corte hepático o parênquima estava vermelho escuro intercalado por extensas áreas alaranjadas. Microscopicamente, o fígado apresentava o parênquima periportal parcialmente obliterado por tecido conjuntivo fibrótico com extensão para outras tríades portais (fibrose em ponte). Houve hiperplasia do ducto biliar, degeneração gordurosa e a colestase extensa era aparente. No cérebro, havia status spongiosus. A análise química de C. incana identificou usaramina e usaramina N-óxido como os principais alcaloides pirrolizidinicos. A concentração dos alcaloides variou de 10μg/g no material da folha a 870μg/g na semente. A associação dos sinais clínicos, achados anatomopatológicos, fitoquímicos e dados epidemiológicos possibilitou o diagnóstico da intoxicação por C. incana no estado de MS, de modo que este deve ser incluído nos diagnósticos diferenciais de doenças com sintomatologia neurológica em bovinos.

90 ABSTRACT

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141 142

143

LEAL, P.V. Experimental models for the study of active principles of toxic plants and determination of the etiopathogeny of mortalities in cattle with undetermined causes. 2018. 109p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

Damage caused by diseases are limiting factors for the livestock activity of cattle, although the economic impact was generated by several cases referred to the emergency services. Regarding toxic plants, despite the diagnostic progress, epidemiology, and clinical pathology triggered by poisoning, knowledge about the toxic principles of plant improvement is still limited. The main difficulty for the identification of the toxic principle is to determine among the various chemical constituents of the plant which one or which are responsible for the pathological clinical picture. The objective of the present thesis was to study the toxic pictures that occur in the state of Mato Grosso do Sul, but that do not have pathological clinical picture and chemical principles completely elucidated. In this way we intend to develop experimental models for the study of active principles of toxic plants and determination of the etiopathogeneses of mortalities in cattle with undetermined causes. The objective of this study was to reproduce the acute intoxication of ammonium oxalate in sheep and to verify if the observed lesions and the crystals of oxalate remain from the time of death until the moment of collection the material for histological examination. The experiment was carried out with the approval of the Committee of Ethics Committee for Animal Use in Experiments (CEUA) of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), under the protocol CEUA-UFMS 884/2017. Five sheep were used, from areas without occurrence of oxalate intoxication, with no defined breed, males and females with six to 48 months of age and weights between 20 and 35 kg, healthy. The animals were given orally by syringe and mixed with the concentrate, ammonium oxalate at the doses of 1.5 g / kg / PV or 0.5 g / kg / PV. With the results it was concluded that the presence of crystals in the rumen mucosa and renal tubules was a constant finding in oxalate intoxication and could be used as a criterion for the diagnosis of this intoxication. The reduction of the observation of these as a function of the time elapsed after the death of the sheep, indicates that this is an important factor to be considered to exclude this intoxication when the crystals are not observed. Article 2 - To test the susceptibility of sheep to V. rubricaulis and establish the clinical signs, laboratory findings and pathological findings, eight sheep were fed with varying doses of the plant. The onset of clinical signs occurred between 6 and 48 hours after the administration of V. rubricaulis and the clinical courses lasted from 6 to 56 hours after ingestion. Ascites and hydropericardium were found to be consistent. Microscopically the centrilobular to massive coagulative necrosis was observed. Coagulative necrosis has also been observed in some proximal renal tubules. The severity of hepatic lesions was proportional to the dose size. The chemical analysis of the carboxyryractyl in the plant material of V. rubricaulis presented a negative result. It is concluded that V. rubricaulis poisoning in sheep has a clinical, biochemical and pathological characteristic of an acute hepatoxic; Article 3 - C. incana intoxication in cattle is rarely documented. Therefore, clinical signs and pathological findings of a case of C. incana intoxication in cattle and the chemical finding of a toxic dehydropyrrolizidine potential in the plant were reported. Significant necropsy findings were limited to the liver, which was markedly enlarged and with rounded edges. The surface of the hepatic cut the parenchyma was dark red interspersed by extensive orange areas. Microscopically, the liver had the periportal parenchyma partially obliterated by fibrotic connective tissue with extension to other portal triads (bridge fibrosis). There was bile duct hyperplasia, fatty degeneration, and extensive cholestasis was apparent. In the brain, there was spongiosus status. Chemical analysis of C. incana identified usaramine and N-oxide as the major pyrrolizidine alkaloids. The concentration of the alkaloids varied from 10µg / g in the leaf material to 870µg / g in the seed. The association of clinical signs, anatomopathological findings, phytochemicals and epidemiological data allowed the diagnosis of C. incana intoxication in the MS state, so that it should be included in differential diagnoses of diseases with neurological symptomatology in cattle.

Key words: Crotalaria incana, oxalate, plant poisoning, Vernonia rubricaulis, pyrrolizidine alkaloids

144 CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Prejuízos econômicos provocados por doenças são fatores limitantes para atividade pecuária de bovinos. Doenças como raiva, botulismo, infecção por BoHV-5, complexo tristeza parasitária bovina, carbúnculo sintomático, intoxicação por plantas e produtos químicos são causas conhecidas de prejuízos devido a mortalidade de bovinos no Mato Grosso do Sul (RIBAS et al 2013)

Importante mencionar que apesar do impacto econômico gerado por estas doenças, um elevado número de casos encaminhados para os serviços de diagnóstico permanece sem a determinação da causa morte. Levantamentos realizados em diferentes períodos demonstram que o número de diagnósticos inconclusivos no Laboratório de Anatomia Patológica (LAP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) supera individualmente as principais causas de morte. Nesses estudos os diagnósticos inconclusivos totalizaram 46,25% das doenças com sintomatologia neurológica (RIBAS et al., 2013), 56,76% dos diagnósticos de surtos em bovinos (SOUZA et al., 2015) e 32,6% dos diagnósticos em ovinos (ALMEIDA et al., 2013).

Frisa-se que dentre estas causas além dos diagnósticos inconclusivos existem vários diagnósticos morfológicos, os quais apesar de sugerirem uma possível etiologia, não determinam com precisão o agente etiológico. Dentre estas podemos citar a polioencefalomalácia, quadros de nefropatias degenerativas (provável causa tóxica), meningoencefalite não supurativa (compatível com raiva) e sugestivos de botulismo (ALMEIDA et al., 2013, RIBAS et al.,2013, SOUZA et al., 2015). Uma hipótese a ser estuda em relação aos quadros de nefropatia tóxica é o papel dos oxalatos presente nas pastagens nativas que, em níveis elevados, podem causar quadros clínicos patológicos semelhantes aos observados nos levantamentos, e se assim for reproduzido, incluí-los como diagnóstico diferenicial.

Em relação as plantas tóxicas, apesar dos avanços na determinação do diagnóstico, da epidemiologia e quadro clínico patológico desencadeado pelas intoxicações, o conhecimento sobre os princípios tóxicos da maioria destas plantas ainda é limitado (TOKARNIA et al., 2012). A principal dificuldade para a identificação do princípio tóxico é determinar dentre os vários constituintes químicos da planta qual ou quais são os responsáveis pelo quadro clínico patológico.

Uma importante planta de interesse pecuário para o estado de Mato Grosso do Sul, a *Vernonia rubricaulis* não possui o princípio tóxico conhecido e experimentos que possam identificar e determinar sua presença nos diferentes estágios vegetativos das plantas precisam ser realizados. Diante disso, é necessária a adoção de modelos experimentais com espécies animais que representem as intoxicações naturais. A execução de experimentos em espécies animais sensíveis com a planta em fase toxica e não tóxica, simultaneamente com a determinação do seu perfil químico, na tentativa de estabelecer qual o princípio causador dos quadros de intoxicação por *V. rubricaulis*.

Os ovinos são considerados bons modelos experimentais, pois são sensíveis à intoxicação por *Vernonia* sp., além de apresentar menor custo de aquisição, menor peso vivo dessa forma consumindo menos volumosos e concentrados e menores quantidades de amostras de planta tóxica; além disso, já foram descritos casos de intoxicação natural e experimental em ovinos por *V. plantaginoides* no Uruguai (DUTRA et al., 2016).

Outra planta tóxica presente no estado do Mato Grosso do Sul são as plantas do gênero Crotalaria. A crotalária é uma planta leguminosa, nativa, de rápido crescimento, facilmente adaptável a solos degradados (ALMEIDA et al., 2016), que tem sido utilizada para adubação verde e por apresentar excelência no controle dos nematóides do solo (pequenas larvas que atacam as plantas) e na fixação biológica de nitrogênio, reduzindo a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados. A grande produção de massa verde faz da crotalária excelente planta para cobertura do solo, para produção de matéria orgânica e para o controle natural das plantas daninhas, em regiões sucroalcoleira esta planta tem sido considerada uma ótima alternativa econômica para renovação de compostos nitrogenados no solo (ALMEIDA et al., 2016, COMAS, 2014).

O princípio tóxico de Crotalaria spp. são alcaloides pirrolizidinicos (APs). APs e seus N-óxidos estão presentes em famílias de plantas tais como Boraginaceae, Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae (MATTOCKS 1986, TOKARNIA et al. 2002, STEGELMEIER, 2011). Estes APs são metabolizados pelas enzimas do citocromo P450 no fígado para os correspondentes "ésteres do tipo pirrol", responsáveis pela toxicidade induzida pelo APs (NEUMAN et al., 2015). A intoxicação por *C. incana* para bovinos é raramente documentada (QUEIROZ et al., 2013). A hepatotoxicidade induzida por APs, pode ser aguda ou crônica (MCLEAN 1970).

As lesões hepáticas induzidas por intoxicações crônicas em consistem em fibrose, megalocitose e proliferação de ductos biliares (BULL, 1961). A função prejudicada do fígado leva a níveis elevados de amônia no sangue (hiperamonemia) e, eventualmente, no cérebro, o que resulta em uma síndrome neurológica chamada encefalopatia hepática (HARRIS et al., 2008). Na pecuária, esta condição é comumente associada à insuficiência hepática causada por plantas que contêm APs (HOOPER, 1975). Mesmo sendo uma legumisona utilizada para adubação verde e comummente observada como invasora de pastagens degradadas do Mato Grosso do Sul, não há relatos no estado de intoxicação em animais de produção por esta planta.

Os aspectos anteriormente abordados resultam em sérios limitantes para o tratamento, prevenção e o controle destas doenças, pois para o controle de uma doença é necessário o conhecer sua etiologia, forma de ocorrencia, princípios químicos, sinais clínicos e as lesões encontradas na necropsia e histopatologia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente projeto é estudar os quadros tóxicos que ocorrem no estado do Mato Grosso do Sul, mas que não possuem quadro clínico patológico e princípios químicos completamente elucidados. Deste modo pretende-se desenvolver modelos experimentais para o estudo de princípios ativos de plantas tóxicas e diagnóstico de mortalidades em bovinos com causas não determinadas.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar os sinais clínicos dos ovinos na intoxicação aguda por oxalato;
- Determinar os danos renais, por meio de urinálise e marcadores de função
 glomerular e tubular renal decorrentes do consumo prolongado de oxalato e da
 intoxicação aguda;
- Descrever as alterações anatomopatológicas por meios de achados de
 necropsia dos ovinos caracterizando as lesões agudas dos quadros de
 intoxicação por oxalatos;
- Avaliar as características histológicas do tecido renal, trato gastrointestinal dos animais submetidos ao consumo de oxalato:

- Comparar as variações na composição química da planta nos diferentes estágios vegetativos com a ocorrência ou não de intoxicação, e por meio da comparação da composição identificar ou direcionar o estudo do princípio tóxico da *V. rubricaulis*.
- Determinar se ovinos são modelos experimentais para quadros de intoxicação
 por *V. rubricaulis*.
- Relatar surto de mortalidade de bovinos que ocorrem por plantas tóxicas, incluindo, se possível, o isolamento do princípio ativo na *Crotalaria incana*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 INTOXICAÇÃO POR OXALATO

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes para economia do estado de Mato Grosso do Sul que possui o quarto maior rebanho bovino do pais, aproximadamente, 21 milhões de cabeças, e ocupa o segundo lugar na produção de carne bovina com 849,062 mil toneladas (IBGE, 2015). No Estado, é importante destacar a pecuária de corte extensiva da região do Pantanal, com o município de Corumbá apresentando o segundo maior rebanho bovino do país (PPM, 2014)

Em virtude desta importância faz-se necessário o conhecimento de condições que possam limitar a produção pecuária, dentre as quais, as enfermidades que afetam o rebanho e podem causar prejuízos econômicos. O consumo de plantas tóxicas está entre as principais causas de perdas econômicas da pecuária brasileira e em Mato Grosso do Sul as mortes causadas por intoxicação fitógena correspondem a 5,8% dos diagnósticos realizados no período de 2008-2012 (SOUZA, 2013).

Entre os compostos tóxicos presentes em algumas plantas nativas ou cultivadas, que proporcionam prejuízos a pecuária estão os oxalatos, compostos orgânicos comuns em plantas e gramíneas tropicais como a *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens*, o Kikuio (*Pennisetum clandestinum*), a *Setaria asceps* cv. *Kazungula, Panicum maximum* cv. Colonião (TOKARNIA et al., 2012).

Convém ressaltar que Mato Grosso do Sul possui na região do Pantanal, aproximadamente, 6.000 km2 de pastagens cultivadas do gênero Brachiaria entre elas a *Brachiaria decumbens, a B. brizantha e a B. humidicola*, distribuídas principalmente, em áreas desmatadas de cordilheiras e de campo (RODRIGUES;

COMASTRI-FILHO, 2001). Essas forrageiras foram introduzidas na região do Pantanal por se adaptarem bem a solos ácidos e de baixa fertilidade, a *B. humidicola* destacou-se pela boa adaptação ao solo da região, apresentando alta produtividade, adaptação as secas prolongadas (CRISPIM et al., 2003), contudo, é importante destacar que essas forrageiras possuem altas concentrações de oxalatos (NUNES et al., 1990).

Os oxalatos ocorrem sob formas solúveis e insolúveis: as formas solúveis são os oxalatos de sódio, potássio e amônia e as insolúveis são os oxalatos ácidos e oxalatos de cálcio (SAVAGE et al., 2000; TOKARNIA et al., 2012). Os oxalatos insolúveis ingeridos são excretados, sem causar prejuízos à saúde animal, entretanto, os oxalatos solúveis presentes em forrageiras possuem propriedades antinutricionais como a capacidade de reagir com microelementos como cálcio e magnésio impedindo sua absorção (GORB et al., 1962), levando ao desequilíbrio no balanço cálcio fósforo (MCKENZIE et al., 1981).

Esse desequilíbrio leva a excessiva mobilização de cálcio dos ossos com consequente desmineralização óssea e sua substituição por tecido conjuntivo fibroso. Essa condição é frequente em equinos e conhecida como hiperparatireidismo nutricional secundário (MCKENZIE et al., 1981; TOKARNIA et al., 2012). Embora menos comum em ruminantes, o consumo prolongado de pastagens com elevados teores de oxalato pode resultar em hipocalcemia severa (SEAWRIGHT et al., 1970) e urolitiase (MCINTOSH et al., 1974) com casos descritos em ovinos (EL- KHODERY et al., 2008).

Quando plantas ricas em oxalato são consumidas, tanto por monogástricos quanto por ruminantes, o cálcio reage com os oxalatos solúveis ingeridos no estômago dos primeiros e no pré-estômago dos segundos, formando sais insolúveis. Entretanto, ao se considerar o metabolismo do oxalato, quando ingerido por ruminantes, observa-se que pode ocorrer de quatro maneiras diferentes: 1- as bactérias ruminais podem fragmenta-los em formas não tóxicas (ALISSON et al., 1985); 2- em dietas com altas concentrações de cálcio e altos teores de oxalatos, os oxalatos presentes no rúmen e nos intestinos se combinam com o cálcio e o magnésio assumindo a forma de cristais de oxalatos, os quais são insolúveis e são excretados nas fezes, reduzindo a absorção de cálcio; 3- o oxalato solúvel ingerido pode ser absorvido a partir do rúmen para o sangue e combinar-se com o cálcio sérico para formar cristais de oxalato insolúveis que podem se precipitar nos rins e

causar danos a esses órgãos como obstrução das vias urinárias ou nefrose com insuficiência renal (BLANEY et al. 1982);4 - os oxalatos insolúveis ingeridos podem passar pelo sistema digestivo sem causar efeitos prejudiciais ao animal (WARD et al. 1979, TOKARNIA et al. 2012).

Considerados os motivos expostos percebe-se que os efeitos adversos e a intoxicação por oxalato são processos complexos, dependentes de vários fatores, dentre os quais pode- se citar a forma química do oxalato, a idade do animal, a taxa de consumo, a quantidade e a qualidade da dieta, a quantidade total de oxalato ingerido e a adaptação do animal ao conteúdo de oxalato na dieta (RAHMAN et al. 2013).

Apesar da capacidade das bactérias do rúmen em metabolizar os oxalatos solúveis (DAVIES, 1979), provavelmente, grande parte do oxalato ingerido passa intacto pelo sistema digestivo dos ruminantes (MCKENZIE; SHULTZ, 1983), pois a maioria das bactérias do rúmen ou do intestino não são capazes de degradar o oxalato.

Os riscos de intoxicação podem ser reduzidos adaptando os ruminantes ao consumo de doses crescentes de oxalatos. Assim se os ruminantes forem expostos gradualmente a uma dieta com níveis elevados de oxalato (período superior a 4 dias) a população de bactérias capazes de degradar o oxalato presentes no rúmen se prolifera para evitar a ocorrência da intoxicação (ALLISSON et al., 1985; BURROWS; TYRL, 1989). Contudo, essa condição apenas se mantém pela ingestão contínua de oxalatos e a taxa de degradação diminui se o consumo é interrompido (MITTAL; KUMMAR, 2004).

Outros fatores relacionados a resistência ou susceptibilidade são: a resistência natural, idade, sexo, o estágio fisiológico e a composição da dieta dos animais (RAHMAN et al., 2013), como exemplo da resistência natural descreve-se diferenças a tolerância entre as espécies animais: rúmen dos caprinos é considerado um ambiente favorável para populações de bactérias que degradam o oxalato quando comparados com ovinos (DUNCAN et al. 1997), além disso, uma quantidade importante de oxalato ingerido por ruminantes pode ser dissolvido na digestão (LIBERT; FRANCESCHI, 1987), porém, equinos são incapazes de utilizar oxalatos de cálcio presentes em forrageiras tropicais (BLANEY et al., 1982; MCKENZIE; SHULTZ, 1983), enquanto que os suínos podem utilizar 80% mais oxalato de cálcio da mesma origem (BRUNE; BREDEHORN,1961).

Animais jovens são considerados mais sensíveis à intoxicação, mas não existem estudos comparativos com animais de diferentes idades (RAHMAN et al. 2013). Embora o excesso de oxalatos possa ocasionar a formação de urólitos tanto em machos quanto em fêmeas, os machos são mais suscetíveis a obstrução uretral, portanto, com manifestação clínica da urolitiase que pode culminar com o rompimento uretral (TIRUNEH, 2004; RAHMAN et al., 2013).

Os ruminantes em lactação são mais suscetíveis do que os não lactantes, devido a excreção de cálcio pelo leite (RAHMAN et al. 2013), no entanto, alguns autores sugerem que animais gestantes e em lactação são mais suscetíveis do que outras categoriais (RADOSTITS et al. 2007). Em ovinos alguns relatos descrevem que animais em lactação apresentam quadro de hipocalcemia com maior frequência que ovelhas prenhes e ovelhas não gestantes (EL KHODERY et al. 2008), mas estudos anteriores relataram que a hipocalcemia foi mais frequente em ovelhas prenhes, principalmente aquelas alimentadas com concentrados (TINDALL, 1986; SWEENEY; CUDDEFORD, 1987).

Devido à complexidade dos fatores envolvidos no metabolismo dos oxalatos não há um consenso sobre os níveis seguros de oxalato presentes nas plantas que possam ser ingeridos pelos animais. No entanto considera-se que níveis menores que 2% de oxalatos solúveis na dieta não causam intoxicação, mas podem provocar decréscimo nos níveis de cálcio. Para os não ruminantes considera-se níveis inferiores a 0,5% como níveis aceitáveis de oxalatos solúveis (RAHMAN et al., 2013). As plantas que provocam a intoxicação aguda ou subaguda contêm mais de 10% de ácido oxálico calculado sobre o peso da planta dessecada, porém há registro da intoxicação com gramínea contendo níveis mais baixos. A intoxicação crônica pode ocorrer por plantas contendo quantidades inferiores as citadas (1 a 4%) de ácido oxálico na matéria seca (BLANEY et al., 1982, MCKENZIE et al., 1981).

Em condições naturais os surtos de intoxicação aguda ou subaguda acometem bovinos e ovinos recentemente introduzidos após privação alimentar em pastagens com plantas com elevados teores de oxalatos. O quadro clínico da intoxicação aguda ou subaguda em bovinos e ovinos caracteriza-se por depressão fraqueza, dificuldade respiratória, diminuição da motilidade do trato digestivo, andar rígido, incoordenação, tetania, tremores, convulsões, edemas subcutâneos, coma e morte (SCHENK et al. 1982).

Os casos ocorrem após um curto período, as vezes de poucas horas após a introdução dos animais na pastagem (TOKARNIA et al. 2012). Dessa forma, o quadro clínico-patológico da intoxicação aguda em bovinos deve ser diferenciado de outras doenças que cursam com sinais nervosos como botulismo, raiva, dentre outras (RIBAS et al., 2013).

No Brasil a intoxicação aguda e subaguda por oxalato foi descrita em ovinos no Rio Grande do Sul (FERREIRA et al., 1991) e caprinos na Paraíba (GALIZA et al., 2011), em ambos os casos os animais ingeriram plantas descritas como ricas em oxalatos, *Oxalis* sp e *Portulaca elatior*, respectivamente. No estado de Mato Grosso do Sul a toxicose foi relatada em vacas lactantes, em mau estado nutricional, introduzidas em pastos de Setaria viridis há 10 dias, neste surto do rebanho de 85 vaca, 45 adoeceram e nove morreram (SCHENK et al. 1982). Ainda são descritos casos de nefropatias tóxicas de etiologia desconhecida, mas com lesões histológicas sugestivas de intoxicação por oxalatos no Estado. Além disso, no Mato Grosso do Sul foi descrito um surto sugestivo de intoxicação por oxalato em novilhas nelores mantidas em pastagem de B. humidicola em propriedades na região do pantanal da Nhecolândia (RIBAS et al., 2013), ressalta-se que essas novilhas eram criadas nestas pastagens, além desses, outros dois casos de intoxicação por oxalato em ovinos foram descritos por ALMEIDA et al. (2013) em Mato Grosso do Sul.

Os principais achados de necropsia em surtos de intoxicação por oxalato são congestão e aumento de volume dos rins com a nítida separação entre córtex e medula, por uma linha branca resultante do acúmulo de oxalatos. Hemorragias e edema na parede do rúmen e edemas cavitários também podem ser observados. A principal alteração histológica é a presença de cristais de oxalatos nos túbulos uriníferos e também nos vasos sanguíneos da parede do rúmen e do sistema nervoso central (JAMES 1978; JONES et al. 1970). Apesar das lesões renais serem identificadas em quadros de intoxicação por oxalato, não se encontram relatos de experimentos que façam uma investigação detalhada destas injúrias por meio do uso de marcadores urinários como a urinálise, a razão proteína urinária: creatinina urinária (PU:CU), gama glutamiltransferase urinária (GGTu) associados a outros marcadores séricos como creatinina, fósforo, cálcio e ureia, utilizados comumente na investigação de danos renais. Os biomarcadores de injúria a esse órgão são considerados importantes métodos de diagnósticos não invasivos e

poderão auxiliar na investigação das alterações clinico patológica causada pela intoxicação por oxalato.

Os efeitos adversos decorrentes da ingestão prolongada de oxalato são observados com frequência em equinos que permanecem por longos períodos em pastagens de gramíneas com altos teores de oxalatos (PUOLI FILHO et al., 1999; TOKARNIA et al. 2012). Essa intoxicação possui o quadro clinico-patológico determinado como hiperparatireoidismo secundário que resulta em osteodistrofia fibrosa.

Os sinais clínicos, nessa espécie, iniciam com claudicação discreta, evoluem para dificuldade locomotora, aumento, característico, bilateral dos ossos maxilares superiores e mandíbulas, e com a progressão dos sinais clínicos há emagrecimento ocasionado pela dificuldade de apreensão e mastigação dos alimentos, se não realizado o tratamento há afrouxamento e queda dos dentes, dificuldade respiratória progressiva, fraturas de membros, caquexia, inanição, decúbito permanente e morte. Em equinos não foram encontrados relatos de intoxicação aguda por oxalato. Os achados de necropsia e histológicos são compatíveis com Osteodistrofia fibrosa e presença de cálculos renais, ureterais e na bexiga (TOKARNIA et al. 2012).

Em ruminantes não se encontram relatos dos efeitos causados pelo consumo prolongado de oxalatos, por outro lado, ressalta-se o elevado número de bovinos com fraturas patológicas durante o manejo descrito no histórico de animais atendidos no laboratório de anatomia patológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LAP/UFMS). Dessa forma, a necessidade da melhor compreensão da etiopatogenia da toxicose por oxalato em ruminantes sugere o desenvolvimento de um modelo experimental no qual possa ser observado os sinais clínicos, e investigados os tipos e a distribuição das lesões nos sistemas de órgão afetados pela intoxicação.

Para isso esta tese teve como um dos objetivos desenvolver um modelo experimental para intoxicação aguda e efeitos adversos do consumo prolongado de oxalato utilizando ovinos, uma vez que, essa espécie é sensível a intoxicação por oxalato (FERREIRA et al., 1991; RAHMAN et al., 2011; ALMEIDA et al. 2013) e oferecem vantagens para realização de pesquisas em relação aos bovinos, pois, são mais fáceis de manejar e requerem menores investimentos com alimentos e infraestrutura.

3.2 INTOXICAÇÃO POR Vernonia rubricaulis

Vernonia rubricaulis é um subarbusto da família Asteraceae, sem nome popular, sendo responsável por mortandades de bovinos na região Centro-Oeste do Brasil (BRUM et al., 2002, TOKARNIA et al., 2012). Em um estudo retrospectivo realizado entre os anos 2000 e 2012, nos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica - LAP (FAMEZ-UFMS) observou-se que a Vernonia rubricaulis foi responsável pela mortalidade de bovinos em 26 surtos diagnosticados no LAP/FAMEZ, o que correspondeu a 25% das intoxicações por plantas tóxicas diagnosticadas durante o período estudado (SOUZA et al., 2015).

Convém ressaltar a descrição de surtos espontâneos de intoxicação em bovinos por *V. rubricaulis* (BRUM et al., 2002) e intoxicações experimentais em bovinos (TOKARNIA & DÖBEREINER, 1982, BRUM et al., 2002). Outras plantas deste gênero causaram intoxicações naturais, como *V. molissima* em bovinos e ovinos (DÖBEREINER et al., 1976, TOKARNIA et al., 2012) e, em ovinos por *V. plantaginoides* (DUTRA et al., 2016). Experimentalmente, foram reproduzidos em bovinos por *V. rubricaulis* (TOKARNIA&DÖBEREINER, 1982, BRUM et al., 2002), em ovinos por *V. plantaginoides* (DUTRA et al., 2016) e em bovinos e ovinos por *V. squarrosa* (TOKARNIA & DÖBEREINER, 1983).

As condições de ocorrência da intoxicação por *Vernonia rubricaulis* são descritas em bovinos principalmente quando há brotação dos pastos, sobretudo depois de queimadas, na época de escassez de forragem, entre os meses de agosto a dezembro (TOKARNIA et al., 2012). Alguns fatores são importantes para a ocorrência da doença, como a utilização de técnicas que favorecem a brotação da planta, incluindo o uso de roçadeira, assim como a queimada e o desmatamento, e fatores que aumentam a possibilidade de ingestão da planta, incluindo o transporte de animais, que são introduzidos com fome ou sede, em áreas em que ocorre a brotação da planta, e a superlotação dos pastos (BRUM et al., 2002, RIET-CORREA & MENDEZ, 2007).

Sob condições naturais, aparentemente a planta só causa intoxicação aguda (TOKARNIA et al., 2012). Os experimentos foram realizados com as partes aéreas, em fase de brotação das plantas, ainda frescas por via oral, em bovinos as doses de *V. rubricaulis* tóxicas que causaram morte variaram de 3 a 30 g/kg de PV (TOKARNIA & DÖBEREINER, 1982, BRUM et al., 2002). A planta dessecada, em temperatura ambiente, parece ter perdido a toxicidade, pois em doses de 27 a 30

g/kg de PV oferecido a bovinos causou apenas sintomas leves (TOKARNIA & DÖBEREINER, 1982). A *V. mollisssima* apresentou comportamento semelhante em bovinos, doses de 10 a 30 g/kg de PV da planta fresca causaram a morte dos animais, nas plantas dessecadas com doses de 20 a 30 g/kg de PV observou-se a morte dos bovinos. Um bovino intoxicado com 20 g/kg de PV conseguiu se recuperar (DÖBEREINER et al., 1976).

Até o momento, a profilaxia e o controle das intoxicações causadas por *Vernonia rubricaulis* são realizadas com base no conhecimento epidemiológico, geralmente, mediante eliminação da planta ou evitando o pastejo em áreas infestadas. Recomenda-se não introduzir animais com fome ou sede em áreas onde ocorre brotação da *V. rubricaulis*, principalmente, após queimadas, roçadas ou após a chuva, aconselha-se também evitar o super pastejo (RIET-CORREA & MENDEZ, 2007). Os dados epidemiológicos evidenciam que a maioria dos animais se intoxicam entre os meses de agosto e dezembro, após o início do período de chuvas (Brum et al., 2002).

Os sinais clínicos descritos são agressividade, anorexia, focinho seco, expiração com gemidos, apatia, andar com deseguilíbrio, tremores na cabeça e contrações musculares. Os animais podem permanecer alguns minutos com a cabeça encostada contra objetos ou cercas, ou fazendo movimentos laterais da cabeça, não conseguindo se alimentar ou beber. Quando em decúbito esternal, apresentam cólicas, gemidos, batem com a cabeça no chão, com movimentos de pedalagem e salivação (TOKARNIA & Döbereiner, 1982, Brum et al., 2002,). Em outras espécies deste mesmo gênero os sinais clínicos são semelhantes (Döbereiner et al., 1976, TOKARNIA & DÖBEREINER, 1983, RIET-CORREA & MENDEZ, 2007, TOKARNIA et al., 2012). Os principais achados de necropsia na intoxicação aguda ou experimental ocorrem no fígado que, ao corte apresentamáreas vermelho enegrecidas circundadas por áreas pálidas (TOKARNIA et al., 2012). Na patologia clínica há elevação dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) (Riet-CORREA &MENDEZ, 2007).

Sabe-se que a parte mais tóxica é a planta em brotação, diminuindo à medida que a planta cresce (TOKARNIA et al., 2012). Salienta-se a importância do reconhecimento do princípio tóxico, uma vez identificado pode-se determinar o período em que a planta se torna potencialmente mais tóxica e, as condições em

que apresentam maior toxicidade e assim, eliminar a experimentação com modelos animais.

No entanto, princípio tóxico da *V. rubricaulis* e de outras espécies de Vernonia ainda é desconhecido. Existem mais de 1000 espécies registradas do gênero Vernonia, mas apenas 10% destas espécies foram catalogadas em estudos etnofarmacológicos. Nestas espécies têm sido relatadas uma infinidade de compostos bioativos. Os principais compostos isolados de diversas espécies de Vernonia são os terpenóides. Estes podem ser subdivididos em monoterpenos, sesquiterpenos, dipertenos, triterpenos e caratenoides. Em amostras de *V. mollissima*, o principal princípio ativo isolado foi o sesquiterpeno (TOYANG & VERPOORTE, 2013). Apesar do isolamento do sesquiterpeno na *V. mollissima*, não é possível associar a presença desse metabólito às intoxicações observadas nos animais de produção.

De modo geral, as plantas tóxicas têm como princípios ativos os mais diversos compostos, mas no geral, apenas um é a causa da doença. Nesse caso, existe uma dificuldade em se determinar o princípio ativo responsável pelas intoxicações (TOKARNIA et al., 2012). As toxinas são metabólitos secundários das plantas, isto é, substâncias químicas que estão diretamente envolvidas no metabolismo fundamental da planta. A maioria não contribui para ganho de energia ou integridade estrutural. São extremamente diversas, apresentando uma grande variedade de tipos químicos. Por vezes, a substância tóxica para o animal não é o composto em si, mas os metabolitos resultantes de sua degradação (LIMA JUNIOR et al., 2010). Em ruminantes, está degradação é mais complexa, pois antes da absorção dos princípios tóxicos pela mucosa do trato digestório, a microflora ruminal pode modificar sua toxicidade por processos de degradação ou conjugação das toxinas, por transformar percussores inofensivos em substâncias tóxicas, ou por converter substâncias pouco tóxicas em mais tóxicas (LIMA JÚNIOR et al., 2010, TOKARNIA et al., 2012).

Estudos fitoquímicos são necessários para confirmar a presença desses terpenos na *Vernonia rubricaulis*, sabidamente tóxica aos bovinos, se estes metabólitos podem ser considerados responsáveis pelos quadros clínicos hepatotóxicos e se as concentrações tóxicas se alteram em diferentes fases vegetativas das plantas. Comparativamente plantas do gênero *Xanthium* (família Asteraceae), assim como a *Vernonia rubricaulis* causam lesões hepatotóxicas, e as

intoxicações são atribuídas a um glicosídeo triterpenóide. O princípio tóxico de *Xanthium* spp se encontra em sementes e é passado para os brotos quando a semente germina. Só as plantas no estágio cotiledonário, com as duas primeiras folhas de brotação, são tóxicas e ao mesmo tempo palatáveis. À medida que essas folhas se desenvolvem, a toxicidade diminui consideravelmente (TOKARNIA et a., 2012), como observado nas intoxicações por *V. rubricaulis*.

O princípio tóxico é um importante fator para o estudo da patogenia, das condições de ocorrência e consequentemente do controle de intoxicações por planta, sua identificação permite avaliar com maior precisão as quantidades dos princípios presente nas plantas administradas em condições experimentais e possibilita identificar as variações em diferentes estágios vegetativos ou a influência de variações produzidas por alterações climáticas ou de manejo. Além disso, a partir do conhecimento das quantidades tóxicas de um princípio e das suas variações nas plantas é possível por meio da dosagem deste princípio nas plantas realizar estudos e preconizar medidas de controle das intoxicações sem a necessidade da experimentação animal. Outro aspecto relevante do ponto de vista da experimentação, é o bem-estar animal. Os modelos empregados atualmente para a reprodução da intoxicação consistem em na observação de sinais clínicos que muitas vezes coincidem com a morte do animal. Assim, a validação de técnicas que identifiquem o princípio tóxico e a determinação da etiopatogenia de doenças não elucidadas permitiriam a redução da utilização de animais em experimentos posteriores, além da possibilidade da adoção de medidas de controle adequadas para o tratamento dos animais intoxicados reduzindo dessa forma os índices de mortalidade, e os prejuízos econômicos e sociais para a cadeia da produção pecuária.

Conforme o exposto acima, o diagnóstico preciso é imprescindível para a redução ou eliminação das perdas econômicas causadas por estas doenças. Ressalta-se que as doenças a serem estudadas na presente tese ainda possuem vários pontos obscuros que somente serão elucidados a partir de modelos e abordagens conjuntas com os estudos de casos espontâneos do campo com as reproduções experimentais.

3.3 Intoxicação por *Crotalaria* sp.

A C*rotalaria* spp. é um subarbusto da família leg. Papilionoidae conhecido por xiquexique, guizo de cascavel ou cocalho de cascavel, devido ao barulho dos frutos quando estão secos e em função que o nome *Crotalaria* advém do termo em latim que significa chocalho (TOKARNIA et al., 2012). Existem mais de 600 espécies de *Crotalaria* em diversas regiões do mundo e muitas delas são tóxicas para os animais (WILLIAMS & MOLYNEUX,1987). No Brasil foram identificadas 40 espécies de *Crotalaria*, destas apenas a *C. mucronata, C. juncea, C. spectabilis* e *C. retusa* foram descritas, sob condições naturais, intoxicações em animais de produção. *C. mucronata* e *C. juncea* foram descritas com quadros respiratório e *C. retusa* e *C. specatabilis* descritas com quadros de alteração hepática (TOKARNIA et al., 2012).

A toxicidade se deve a presença da monocrotalina, que é um alcaloide pirrolizidinco, responsável por quadros de intoxicações em animais e humanos (WIEDENFELD et al., 2010). Há relatos de intoxicações no continente americano, africano na ásia e oceania (BRYAN et al., 2009, WIEDENFELD et al., 2010), em condições espontâneas há relatos em suínos (UBILANI et al. 2011), equinos (ROBINSON et al., 2015), bovinos (LEMOS et al., 1997), ovinos (LUCENA et al., 2010) e caprinos(BARRI et al., 1984). Suínos são as espécies mais sensíveis e os ovinos mais resistentes aos AP's, bovinos e equinos tem resistência intermediária (CULEN et al., 2012). Surtos em equinos são mais comuns devido a sua maior palatabilidade para esta espécie (RIET-CORREA & MENDEZ, 2007).

Intoxicação por espécies do gênero *Crotalaria*, apresentam dois quadros clínicos. Respiratório caracterizado por edema pulmonar, fibrose intersticial, espessamento alveolar e enfisema. E de insuficiência hepática caracterizado por lesões hepáticas progressivas após ingestão crônica da planta, cursando em muitos casos em quadro de encefalopatia hepática (RIET-CORREA&MENDEZ, 2007). Todas as partes da planta possuem o princípio tóxico, sendo mais concentrada nas sementes (TOKARNIA et al., 2012). Em bovinos os surtos espontâneos por ração contaminada por sementes de *Crotalaria mucronata* em um confinamento (LEMOS et al.,1997) e em extensivamente animais mantidos em piquete intensamente invadido por *Crotalaria icana* (QUEIROZ et al., 2013). Em súinos a ocorrência de surto está relacionado a concentrado contaminado com sementes (UBILANI et al., 2011), dietas compostas com utilização desta planta

- 610 como banco proteico intoxicando equinos (NOBRE et al., 2004), ovinos e caprinos
- 611 na época de seca quando há baixa disponibilidade forrageira associada com a
- 612 brotação da planta (RIET-CORREA &MENDEZ, 2007, TOKARNIA et al., 2012).

613

614

5. REFERÊNCIAS:

- 615 ALLISON, M. J.; DAWSON, K. A.; MAYBERRY, W. R..; FOSS, J. G. Oxalobacter
- 616 formigenes gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the
- gastrointestinal tract. Archives of Microbiology, 1985. 141: 01-07.
- 618 ALMEIDA, DS. Recuperação ambiental da mata atlântica [online].3rd ed. rev.
- and enl. Ilhéus, BA: Editus, 2016. ISBN 978-85-7455-440-2. Available from SciELO
- 620 Books < http://books.scielo.org/ >
- 621 ALMEIDA, T.L.; BRUM, K.B.; LEMOS, R.A.A.; LEAL, C.R.B.; BORGES, F.A.
- 622 Doenças de ovinos diagnosticadas no Laboratório de Anatomia Patológica
- 623 Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (1996-2010). Pesquisa
- 624 *Veterinária Brasileira*, 2013. 33:21-29.
- 625 BLANEY, B. J.; GARTNER, R. J. W.; HEAD, T. A. The effects of oxalate in tropical
- 626 grasses on calcium, phosphorus and magnesium availability to cattle. The
- 627 *Journal of Agricultural Science*, 1982. 99: 533-539.
- 628 Boghossian M.R., Peixoto P.V., Brito M.F. & Tokarnia C.H. 2007. Aspectos clínico-
- 629 patológicosda intoxicação experimental pelas sementes de
- 630 Crotalariamucronata(Fabaceae) em bovinos.Pesg. Vet.Bras. v.27(4) p.149-156.
- 631 BRUM, K. B., HARAGUSH, M., LEMOS, R.A.A., RIET-CORREA, F., FIORAVANTI,
- 632 M.C.S. Cr Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing crystal-
- 633 associated cholangiopathy in sheep grazing Brachiaria decumbens
- containing the saponin protodioscin. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2007. v.27,
- 635 n.1, p.39-42.
- 636 BRUM, K.B, PURISCO, E., LEMOS, R.A.A., RIET-CORREA, F. Intoxicação por
- 637 Vernonia rubricaulis em bovinos em Mato Grosso do Sul. Pesquisa Veterinária
- 638 Brasileira. 2002. v.22, n.3, p.119-128.
- 639 BRUNE, H.; BREDEHORN, H.. On the physiology of bacterial degradation of
- 640 calcium oxalate and the ability to utilize calcium from calcium oxalate in the
- pig. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 1961.16:214–236.
- 642 BRYAN L. STEGELMEIER, DALER. GARDNER, T. ZANE DAVIS 2009, Livestock
- 643 Poisoning With Pyrrolizidine-Alkaloid-Containing Plants (Senecio, Crotalaria,
- 644 Cynoglossum, Amsinckia, Heliotropium, and Echium spp.) Rangelands, v.31(1):p.
- 645 35-37.
- 646 BULL, L.B., Liver disease in livestock from intake of hepatotoxic substances.
- 647 Aust. Vet. J. 1961. 37, 126-130.
- 648 BURROWS, G. E.; TYRL, R. J. Plants causing sudden death in livestock.
- Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 1989. 5:263–289.
- 650 COMAS, C. R. C., 2014. Crotalária é uma boa alternativa para a renovação de
- 651 canaviais Embrapa Agropecuária Oeste. Disponível em

- 652 https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2380275/crotalaria-e-uma-boa-
- alternativa-para-a-renovacao-de-canaviais acessado em 12 de setembro de 18.
- 654 CRISPIM, S.M.A.; BARIONI JÚNIOR, W.; BRANCO, O. Valor nutritivo de
- 655 Brachiaria decumbens e Brachiaria humidicola no Pantanal Sul-
- 656 MatoGrossense. 2003. 4p. Corumbá: Embrapa Pantanal (Embrapa Pantanal.
- 657 Circular técnica, 43).
- 658 Culen J.M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: Zachary, J.F. &McGavin,
- 659 M.D. PathologicBasisofVeterinayDisease. 2012. Missouri, Editora Elsevier. p.613-
- 660 691.
- 661 CULLEN, J.M., STALKER, M.J. Hepatic dysfunction. In: Maxie, M.G. (Ed.), Jubb,
- Kennedy, and Palmer, sixth ed. Vol. 2. Elsevier, St. Louis. 2016. p. 290-295.
- DÖBEREINER, J. TOKARNIA, C.H., PURISCO, E. Vernonia mollissima, planta
- 664 tóxica responsável por mortandades em bovinos no sul de Mato Grosso.
- Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1976. v.11, p.49-58.
- 666 DUNCAN, A. J.; FRUTOS, P.; YOUNG, S.A. Rates of oxalic acid degradation in
- the rumen of sheep and goats in response to different levels of oxalic acid
- administration. Animal Science. 1997 65: 451-455.
- 669 DUTRA, F., ROMERO, A., QUINTEROS, C., ARAUJO, R., SANTOS, C.G.
- 670 Poisoning of sheep by Vernonia plantaginoides (Less.) Hieron in Uruguai.
- Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2016. p.1-7.
- 672 EI-KHODERY, S.; EI-BOSHY, M.; GAAFAR, K.; ELMASHAD, A. Hypocalcaemia
- 673 in Ossimi Sheep Associated with Feeding on Beet Tops (Beta vulgaris). Turk.
- 674 J. Vet. Anim. Sci.2008. 32:199-205.
- 675 espontânea por Crotalariamucronata em bovinos em Minas Gerais. Arqs Inst.
- 676 Biológico, São Paulo, 64(Supl.), Resumo 46.
- 677 GALIZA G.J.N.; LUCIANO A.P.; OLIVEIRA D.M.; PIEREZAN F.; DANTAS A.F.M;
- 678 MEDEIROS R.M.T.; RIET-CORREA, F. Intoxicação por Portulaca elatior
- 679 (*Portulacaceae*) em caprinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2011. 31:465-470.
- 680 Grecco F.B., Schild A.L., Soares M.P., Marcolongo-Pereira C., Estima-Silva P.
- 681 &Sallis E.S.V. 2010. Epidemiologicalaspectsandhepaticlesionspattern in 35
- 682 outbreaksofSenecio spp. poisoning in cattle in southernBrazil. Pesq.
- 683 Vet.Bras.V.30(5) p. 389-397.
- 684 Gustavo Rodrigues Queiroz, G.R. et al. 2013. Intoxicação espontânea por
- 685 Crotalaria incana em bovinos no norte do estado do Paraná Semina: Ciências
- 686 Agrárias, Londrina, v. 34, n. 2, p. 823-832, mar./abr.
- 687 HARRIS, J., CHIMELLI L., KRIL J., RAY, D. Hepatic encephalopathy, p.693-694.
- In: Love S., Louis D.N. & Ellison D.W. (Eds), Greenfield's Neuropathology. Vol.1.
- 689 8th ed. Hodder Arnold, London. 2008.
- 690 HOOPER, P.T., Spongy degeneration in the central nervous system of
- 691 **domestic animals. II.** Chemical analysis and vascular permeability studies. Acta
- 692 Neuropathol. 1975.31:335-341.
- 693 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em:
- 694 http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagrope
- 695 cuaria/ Acesso em: 08/05/2016.
- 696 JAMES, L. F. Oxalate toxicosis. Clinical Toxicology, 5, 1978. 231–243.

- 697 Lemos R.A.A., Dutra I.S., Souza G.F., Nakazato L. & Barros C.S.L. 1997.
- 698 Intoxicação
- 699 LEMOS, R.A.A., DUTRA I.S., SOUZA, G.F., NAKAZATO, L., BARROS, C.S.L.
- 700 1997, Intoxicação espontânea por Crotalaria mucronata em bovinos em Minas
- 701 **Gerais.** Args Inst. Biológico, São Paulo, 64 (Supl.), Abstract # 46.
- 702 LIBERT, B.; FRANCESCHI, V. R. Oxalate in crop plants. Journal of Agricultural
- 703 and Food Chemistry, 1987. 35: 926–938.
- 704 LIMA JUNIOR, D.M., MONTEIRO, P.B.S., RANGEL, A.H.N., MACIEL, M.V.,
- 705 OLIVEIRA, S.E.O., FREIRE, D.A. Fatores anti-nutricionais para ruminantes.
- 706 Acta Veterinaria Bras. 2010. v.3, n.4, p.132-143.
- 707 Lucena R.B., Rissi D.R., Maia L.A., Dantas A.F.M., Flores M.A., Nobre V.M.T., Riet-
- 708 Correa F. & Barros C.S.L. 2010. Poisoningbypyrrolizidinealkaloids ir
- ruminantsandhorses in Brazil.Pesq. Vet. Bras.v.30(5):p.447-452.
- 710 MATTOCKS, A.R., Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids.
- 711 Academic Press, London, New York. 1986. p 196.
- 712 MCINTOSH G.H., PULSFORD M.F., SPENCER W.G.; ROSSER H. A study of
- 713 urolithiasis in grazing ruminants in south Australia. Aust. Vet. J, 50:345-
- 714 350,1974.
- 715 MCKENZIE, R. A.; GARTNER, R. J. W.; BLANEY, B. J.; GLANVILLE, R. J. Control
- of nutritional secondary hyperparathyroidism in grazing horses with calcium
- 717 plus phosphorus supplementation. Australian Veterinary Journal. 1981. 57: 554–
- 718 557.
- 719 McKENZIE, R.A.; SCHULTZ, K. Confirmation of the presence of calcium oxalate
- 720 **crystals in some tropical grasses.** The Journal of Agricultural Science, v. 100, n.
- 721 01, 1983. p. 249-250.
- 722 MCLEAN, E.K. The toxic actions of pyrrolizidine (Senecio) alkaloids. Pharm.
- 723 Rev. 1970. 33, 429-483.
- 724 MINSON, D. J., Forage in Ruminant Nutrition. Academic Press, San Diego, CA.
- 725 1990.
- 726 MITTAL, R.D.; KUMAR, R. Gut-inhabiting bacterium Oxalobacter formigenes:
- role in calcium oxalate urolithiasis. Journal of endourology, 2004. 18:418-424.
- 728 Newman J.S. Confer A. W., Pancieira R.J. Sistema urinário. In: Zachary, J.F.
- 729 &McGavin, M.D. PathologicBasisofVeterinayDisease. 2012. Missouri, Editora
- 730 Elsevier. p.613-691.
- 731 Nobre V.M.T., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Tabosa I.M., Medeiros R.M.T. &
- 732 Barbosa Filho J.M. 2004a. IntoxicationbyCrotalariaretusa in ruminantsandequidae
- in thestateofParaiba, NortheasternBrazil, p.275-279. In: Acamovic T., Stewart C.S.
- 734 &Pennycott T.W. (ed.), PoisonousPlantsandRelatedToxins. CABI Publ.,
- 735 Wallingford, UK.
- 736 NUNES, S.G.; SILVA, J.M.; SCHENK, J.A.P. Problemas com cavalos em
- 737 pastagem de humidícola. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1990. 4p.
- 738 (EMBRAPA-CNPGC. Comunicado Técnico, 37).
- 739 PPM- Produção Pecuária Municipal. 42:1-39, 2014. Disponível em
- 740 http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf.Ace
- 741 sso em: 14.06.2016.

- 742 Pierezan F., Oliveira Filho J.C., Carmo P.M., Lucena R.B., Rissi, D.R., Togni M. &
- 743 Barros C.S.L. 2010. Surto de aflatoxicose em bezerros no Rio Grande do Sul. Pesq.
- 744 Vet. Bras. V.30(5)p.418-422.
- 745 PUOLI FILHO, J. N. P., ARRIGONI, C. C., DE BENI, M., & SILVEIRA, A. C. Effect
- of mineral supplement on calcium mobilization from bone of equine grazing
- 747 Brachiaria humidicola. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1999. 34: 873-878,
- 748 QUEIROZ, G.R., RIBEIRO, R.C.L., FLAIBAN, K.K.M.C., BRACARENCE, A.P.,
- 749 LISBÔA, J.A.N. Intoxicação espontânea por Crotalaria incana em bovinos no
- 750 **norte do estado do Paraná**. Semina. 2013 34, 823-832.
- 751 RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. Veterinary medicine: a
- 752 textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10.ed.
- 753 Philadelphia: Saunders, 2007. 2156p.
- 754 RAHMAN, M.M.; ABDULLAH, R.B.; WAN KHADIJAH, W.E. A review of oxalate
- poisoning in domestic animals: tolerance and performance aspects. Journal of
- animal physiology and animal nutrition, 2013. 97: 605-614.
- 757 RAHMAN, M.M.; NAKAGAWA, T.; NIIMI, M., FUKUYAMA, K.; KAWAMURA, O.
- 758 Effects of feeding oxalate containing grass on intake and the concentrations
- 759 of some minerals and parathyroid hormone in blood of sheep. Asian-
- Australasian Journal of Animal Sciences, 2011. 24:940-945.
- 761 RIBAS, N. L., CARVALHO, R. I., SANTOS, A. C. D., VALENÇOELA, R. A.,
- 762 GOUVEIA, A. F., CASTRO, M. B. D., LEMOS, R. A. Diseases of the nervous
- 763 system of cattle in Mato Grosso do Sul, Brazil:1082 cases. Pesquisa Veterinária
- 764 Brasileira, 2013. 33: 1183-1194.
- 765 RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C. Intoxicações por plantas e micotoxinas. In:
- 766 RIET-CORREA, F.; SHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. (Ed) Doenças
- de Ruminantes e Equídeos. 3.ed. Pallotti:Fernovi, 2007. p.39-42.
- 768 ROBINSON B. & B. GUMMOW. A field investigation in to a suspected outbreak
- of pyrrolizidine alkaloid toxicosis in horses in western Queensland, 2015
- 770 Preventive Veterinary Medicine v.118 p.378–386.
- 771 RODRIGUES, C. A. G., COMASTRI FILHO, J. A. A pecuária e as pastagens do
- 772 Pantanal. Corumbá: EMBRAPA Pantanal; (Artigo de divulgação na mídia, n 09).
- 773 p. 3. 2001.
- 774 SANTOS, S. A.; CRISPIM, S. M. A.; COMASTRI FILHO, J. A.; POTT, A.;
- 775 CARDOSO, E. L. Substituição de pastagem nativa de baixo valor nutritivo por
- 776 forrageiras de melhor qualidade no Pantanal. Embrapa Pantanal. Circular
- 777 Técnica, 2005. 62:4.
- 778 SAVAGE, G. P.; VANHANEN, L.; MASON, S. M.; ROSS, A. B. Effect of cooking
- on the soluble and insoluble oxalate content of some New Zealand foods.
- 780 Journal of Food Composition and Analysis, 2000. 13:201–206.
- 781 SCHENK, M.A.M.; DE FARIA FILHO, T.T.; PIMENTEL, D.M.; THIAGO, L.R. L.D.S.
- 782 Intoxicação por oxalatos em vacas lactantes em pastagem de
- 783 **sectária**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1982. 17: 1403-1407.
- 784 SEAWRIGHT, A.A.; GROENENDYK, S.; SILVA, K.I. An outbreak of oxalate
- 785 **poisoning in cattle grazing Setaria sphacelata.** Australian Veterinary Journal.
- 786 1970.46:293:296.

- 787 SOUZA, R.I.C., SANTOS, A.C., RIBAS, N.L.K.S., COLODEL, E.M., LEAL, P.V., PUPIN,
- 788 R.C., CARVALHO, N.M., LEMOS, R.A.A. Doenças tóxicas de bovinos em Mato
- 789 **Grosso do Sul.** Semina: ciências agrárias, v.36, n.3, p.1355-1368, 2015.
- 790 STEGELMEIER, B.L. Pyrrolizidine alkaloid-containing toxic plants (Senecio,
- 791 Crotalaria, Cynoglossum, Amsinckia, Heliotropium, and Echium spp.). Vet.
- 792 Clin. North. Am. Food Anim Pract. 2011. 27, 419-428.
- 793 SWEENEY, H. J.; CUDDEFORD, D. An outbreak of hypocalcemia in ewes
- 794 associated with dietary mismanagement. Veterinary Record. 1987. 120:114
- 795 TINDALL, J. R: Hypocalcemia in housed ewes. Veterinary Record, 118:518-
- 796 519,1986.
- 797 TIRUNEH, R. Minerals and oxalate content of feed and water in relation with
- 798 ruminant urolithiasis in Adea district, central Ethiopia. Revue de Medicine
- 799 Veterinaire. 2004. 156: 272–277.
- 800 TOKARNIA C.H., DÖBEREINER J. & PEIXOTO P.V. 2012. Plantas Tóxicas do
- 801 **Brasil**.Editora Helianthus, Rio de Janeiro. P.173-204.
- 802 TOKARNIA C.H., PEIXOTO P.V. & DÖBEREINER J. Poisonous plants affecting
- heart function of cattle in Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira. 1990.v.10, n.
- 804 1/2, p.1-10.
- 805 TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J. Intoxicação de bovinos por Vernonia
- 806 *rubricaulis* (Compositae) em Mato Grosso. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 2,
- 807 n.4, p.143-147, 1982.
- 808 TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J. Intoxicação experimental por Vernonia
- 809 squarrosa (Compositae) em ovinos e bovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira.
- 810 1983. v.3, n.2, p.45-52.
- 811 TOKARNIA, C.H., Döbereiner, J., Peixoto, P.V. Poisonous plants affecting
- 812 **livestock in Brazil.** Toxicon 40, 2002. 1635-1660.
- 813 TOKARNIA, C.H; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER J.
- Plantas Tóxicas do Brasil para animais de produção. Rio de Janeiro: Helianthus,
- 815 2012. 566p.
- 816 TOYANG, N.J., VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants
- of the genus Vernonia (Asteracea). Journal of Ethnopharmacology. 2013.v.146,
- 818 p.681-723.
- Ubiali D.G., Boabaid F.M., Borges N.A., Caldeira F.H.B., Lodi L.R., Pescador C.A.,
- 820 Souza M.A. &Colodel E.M. 2011. Intoxicação aguda com sementes de *Crotalaria*
- spectabilis (Leg. Papilionoideae) em suínos. Pesq. Vet. Bras. V. 31(4) p.313-318.
- WARD, G.; HARBERS, L.H.; BLAHA, J.J. Calcium-Containing Crystals in Alfalfa:
- 823 **Their Fate in Cattle 1, 2**. Journal of dairy Science. 1979. 62: 715-722.
- Wiedenfeld H. & Edgar, J. 2010. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and
- ruminants. Phytochem Rev . v 10:p.137–151.
- Williams, M. C.; Molyneux, R. J. 1987. Occurrence, concentration, and toxicity of
- pyrrolizidine alkaloids in Crotalaria seeds. Weed Science, Champaign, v. 35, n. 4,
- 828 p. 476-481.
- Williams, M.C. and Molyneux, R. J., Occurrence, concentration, and toxicity of
- pyrrolizidine alkaloids in Crotalaria seeds. Weed Sci. 1987. 35, 476-481.

846 CAPÍTULO 2 - ARTIGO - INTOXICAÇÃO POR OXALATO DE 847 AMÔNIA EM OVINOS

201. Leal P.V., Godoy K.C.S., Pupin R.C., Paula J.R.L. & Lemos R.A. A. 2018. Intoxicação experimental por oxalato de amônia em ovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira 38(Supl.):347-350. Laboratório de Anatomia Patológica, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Senador Felinto Muller 2443, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil, E-mail: paulavleal15@gmail.com

O autor P.V. Leal é financiado pela bolsa de estudos da FUNDECT (Nº3/2017)

Introdução: O Mato Grosso do Sul possui na região do Pantanal, aproximadamente, 6.000 km² de pastagens cultivadas do gênero Brachiaria entre elas a Brachiaria decumbens, a B. brizantha e a B. humidicola, distribuídas principalmente, em áreas desmatadas de cordilheiras e de campo (Rodrigues O & Comastri-Filho 2001). Essas forrageiras foram introduzidas na região do Pantanal por se adaptarem bem a solos ácidos e de baixa fertilidade. Dentre estas a B. humidicola destacouse pela boa adaptação ao solo da região, apresentando alta produtividade, e resistência as secas prolongadas (Crispim et al, 2003), no entanto, é importante destacar que essas forrageiras possuem altas concentrações de oxalatos (Nunes et al. 1990). Em condições naturais os surtos de intoxicação aguda ou subaguda acometem bovinos e ovinos recentemente introduzidos após privação alimentar em pastagens com plantas com elevados teores de oxalatos, O quadro clínico da intoxicação aguda ou subaguda em bovinos e ovinos caracteriza-se por depressão fraqueza, dificuldade respiratória, diminuição da motilidade do trato digestivo, andar rígido, incoordenação, tetania, tremores, convulsões, edemas subcutâneos, coma e morte

849

850

851

852

853

(Schenk et al. 1982, Tokarnia et al. 2012). Dessa forma, é preciso conhecer o quadro clínico patológico quadro clínico-patológico da intoxicação aguda em ruminantes, principalmente para determinar se sempre serão observadas lesões microscópicas para diferenciar de doenças que não causam, como exemplo botulismo (Ríbas et al. 2013). O objetivo do presente trabalho é reproduzir a intoxicação aguda em ovinos e verificar se as lesões observadas e os cristais de oxalato permanecem desde

Quadro 1, Intoxicação experimental por oxalato em ovinos, Delineamento experimental e progressão dos sinais clínicos

Animal	Idade (meses)	Dose (g/kg/PV)	Início dos SC	Duração	Progressão	
Ovino 1	24	1,5	imediato	30 minutos	6bito	
Ovino 2	48	0,5	4 horas	24 horas	recuperou-se	
Ovino 3	48	0,5	4 horas	28 horas	eutanásia	
Ovino 4	8	0,5	2 horas	6 horas	eutanásia	
Ovino 5	8	0,5	2 horas	20 horas	recuperou-se	

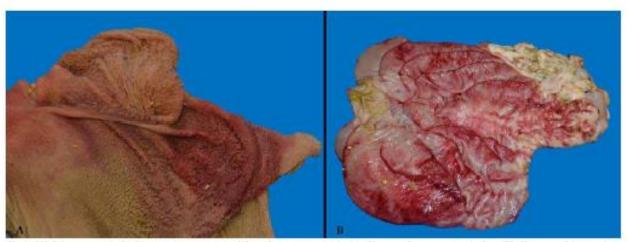


Fig.1. (A) Rúmen e retículo, hiperemia acentuada difusa da mucosa ruminal e discreta da mucosa reticular. (B) Abomaso, hiperemía e edema acentuado, mais evidente nos ápices das pregas abomasais.

Pesq. Vet. Bras. 38(Supl.), outubro 2018

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

Leal P.V., Godoy K.C.S, Pupin R.C., Paula J.P.L & Lemos R.A. A. 2018. Intoxicação experimental por oxalato de amônia em ovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira 38(Supl.):00-00. Laboratório de Anatomia Patológica. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Senador Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil. E-mail: paulavleal15@gmail.com.

O autor P.V. Leal é financiado pela bolsa de estudos da FUNDECT (Nº3 / 2017).

1.1 Introdução

O Mato Grosso do Sul possui na região do Pantanal, aproximadamente, 6.000 km2 de pastagens cultivadas do gênero Brachiaria entre elas a Brachiaria decumbens, a B. brizantha e a B. humidicola, distribuídas principalmente, em áreas desmatadas de cordilheiras e de campo (Rodrigues O & Comastri-Filho 2001). Essas forrageiras foram introduzidas na região do Pantanal por se adaptarem bem a solos ácidos e de baixa fertilidade. Dentre estas a B. humidicola destacou-se pela boa adaptação ao solo da região, apresentando alta produtividade, e resistência as secas prolongadas (Crispim et al. 2003), no entanto, é importante destacar que essas forrageiras possuem altas concentrações de oxalatos (Nunes et al. 1990). Em condições naturais os surtos de intoxicação aguda ou subaguda acometem bovinos e ovinos recentemente introduzidos após privação alimentar em pastagens com plantas com elevados teores de oxalatos. O quadro clínico da intoxicação aguda ou subaguda em bovinos e ovinos caracteriza-se por depressão fraqueza, dificuldade respiratória, diminuição da motilidade do trato digestivo, andar rígido, incoordenação, tetania, tremores, convulsões, edemas subcutâneos, coma e morte (Schenk et al. 1982, Tokarnia et al. 2012). Dessa forma, é preciso conhecer o quadro clínico patológico quadro clínico-patológico da intoxicação aguda em ruminantes, principalmente para determinar se sempre serão observadas lesões microscópicas para diferenciar de doenças que não causam, como exemplo botulismo (Ribas et al. 2013). O objetivo do presente trabalho é reproduzir a intoxicação aguda em ovinos e verificar se as lesões observadas e os cristais de oxalato permanecem desde de o momento da morte até o momento para coleta o material para exame histológico.

1.2 Materiais e métodos

O experimento foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética Comitê de Uso Animal em Experimentos (CEUA) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o protocolo CEUA-UFMS 884/2017. Foram utilizados cinco ovinos, provenientes de áreas sem a ocorrência da intoxicação por oxalato, sem raça definida, machos e fêmeas com seis a 48 meses de idade e pesos entre 20 e 35 kg, hígidos. Os animais receberam, por via oral, através de seringa e misturado junto ao concentrado, oxalato de amônia, nas doses de 1,5g/kg/PV ou 0,5g/kg/PV conforme demostrado no quadro 1. Os ovinos foram submetidos a exame físico antes da administração do princípio tóxico, com realização de novo exame clínico se os animais apresentarem sinais clínicos. Foram colhidos 10 ml de sangue antes da administração do oxalato e a cada quatro horas no decorrer do experimento, as amostras foram colhidas por venopunção da jugular. Para verificação das funções glomerulares e tubulares renais foram realizadas dosagens séricas de creatinina, ureia e fósforo, cálcio ionizado, urinálise e dosagens urinárias de gama glutamil transferase (GGT), proteína, creatinina, fósforo e cálcio. Os ovinos que morreram ou apresentaram sinais clínicos graves foram submetidos a eutanásia e a necropsia imediatamente após a morte, com a coleta fragmentos dos diversos órgão, que foram fixados em formol tamponado a 10% e processado rotineiramente para hematoxilina-eosina (HE). Fragmentos de rim e rúmen foram mantidos em temperatura ambiente e colocados em formol a cada duas horas até 12 horas após a morte.

1.3 Resultados

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

Dos cinco animais intoxicados experimentalmente, três morreram (um por morte espontânea e dois foram submetidos a eutanásia in extremis) e os outros dois apresentaram sinais clínicos leves, elevações nas atividades enzimática de ureia e creatinina, no entanto se recuperaram. O tempo de aparecimento dos sinais clínicos variou de 0,5 a 24 horas após o início da intoxicação (Quadro 1). Estes sinais consistiram em movimentos involuntários dos lábios, tremores generalizados progredindo para convulsões e morte no quadro mais agudo. Nos quadros subagudos os animais apresentaram tremores, anúria, estomatite ulcerativa, apatia severa, anorexia, edema de córnea, sendo submetidos a eutanásia In extremis. As concentrações de ureia e creatinina de todos os animais se alteraram em até 300x num intervalo de 24 horas. Os níveis plasmáticos de cálcio reduziram-se apenas

entre a primeira e a segunda coleta dos animais, após a terceira os níveis deste eletrólito se estabilizaram. Todos os animais apresentaram leucocitose e aumento sérico de lactato. As alterações macroscópicas de um modo geral consistiram de cianose das mucosas, hiperemia, hemorragia e edema no rúmen (Fig.1a) e abomaso (Fig.1b) e palidez renal com evidenciação da divisão corticomedular (Fig.2). Na microscopia observou-se aumento do volume das papilas ocasionado pela vacuolização citoplasmática das células epiteliais ruminais associada a moderado infiltrado de neutrófilos na mucosa e submucosa (degeneração balonosa)(Fig.3a e b) e estas vesículas por vezes estavam repletas de cristais de oxalato (Fig.3c e d), no rim observou-se degeneração tubular aguda associada a presença de cristais intraluminais (Fig.4a). Nos fragmentos processados em diferentes intervalos de tempo após a morte dos ovinos houve variação na morfologia da lesão, sendo estas compatíveis com alterações autolíticas, inclusive proliferação de bacilos da putrefação, nos fragmentos de seis horas em diante. Houve também redução da observação dos cristais, podendo haver possibilidade de não serem vistos, ou raramente serem observados, nas coletas de oito e 12 horas após a morte (Fig.4b).

1.4 Discussão

O quadro clínico patológico reproduzido de insuficiência renal associadas as elevações enzimáticas de ureia e creatinina e presença de cristais de oxalato nos túbulos renais foram semelhantes aos relatos anteriores (Schenk et al. 1982, Rahman et al. 2013). No entanto não houve alterações progressivas nos níveis sérios de cálcio como descrito por (James et al. 1971). Os níveis de cálcio estão diretamente relacionados aos níveis de paratormônio (PTH) (Mendonza et al. 2016). Em situações de hipocalcemia abrupta um minuto após a alteração do nível plasmático a paratireoide começa a secretar PTH e em no máximo 60 minutos os níveis estão reestabilizados (Kumar & Thompson 2011), o que justifica o estabelecimento dos níveis séricos de cálcio da segunda para a terceira coleta.

É descrito que animais jovens são mais suscetíveis à intoxicação do que animais adultos, mas não existiam até então estudos comparativos com animais de diferentes idades (Rahman et al. 2013), no presente estudo tanto animais jovens (ovinos, 4 e 5) e animais adultos (ovino 2 e 3), que receberam a mesma dosagem do sal, apresentaram sinais semelhantes, um de cada categoria morreu e um se

recuperou. Todos apresentaram alterações nas atividades enzimáticas de ureia e creatinina. O ovino 1 apresentou sinais clínicos agudos, com progressão de uma hora até a sua morte, casos espontâneos são descritos que podem ocorrer por vezes em horas após a introdução dos animais na pastagem que contem altos níveis de oxalatos na composição (Tokarnia et al. 2012).

Conclusão: A presença de cristais na mucosa do rúmen e em túbulos renais foi um achado constante na intoxicação por oxalatos e pode ser usado como critério para o diagnóstico desta intoxicação. A redução da observação dos mesmos em função do tempo decorrido após a morte dos ovinos, indica que este é um fator importante a ser considerado para excluir esta intoxicação quando os cristais não são observados.

Agradecimentos:

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia (FUNDECT) do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT / CNPq - Outorga 15/2014 - PRONEM -MS - Concessão 59 / 300.126 / 2015). e pelo FUNDECT do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT / CAPES nº 05/2014 - PVMS - 59 / 300.032 / 2015).

1.5 Referências:

- Almeida T.L., Brum K.B., Lemos R.A.A., Leal C.R.B. & Borges F.A. 2013.

 Doenças de ovinos diagnosticadas no Laboratório de Anatomia Patológica Animal
 da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (1996-2010). Pesq. Vet. Bras.
 33:21-29. –
- 975 Crispim, S.M.A., Barioni Júnior, W. & Branco, O. 2003. Valor nutritivo de 976 Brachiaria decumbens e Brachiaria humidicola no Pantanal Sul-MatoGrossense. 977 4p. Corumbá: Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 43
- 978 Galiza G.J.N., Luciano A.P., Oliveira D.M., Pierezam F., Dantas A.F.M., 979 Medeiros R.M.T.& Riet-Correa, F. 2011. Intoxicação por Portulaca elatior 980 (Portulacaceae) em caprinos. Pesq. Vet. Bras. 31:465-470.
- Nunes, S.G., Silva, J.M., Schenk, J.A.P. 1990. Problemas com cavalos em pastagem de humidícola. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 4p. (EMBRAPA-CNPGC. Comunicado Técnico,37).
- Rahman, M.M., Abdullah, R.B. & Wan Khadijah, W.E. 2013. A review of oxalate poisoning in domestic animals: tolerance and performance aspects. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 97: 605-614.

987 Ribas, N. L., Carvalho, R. I., Santos, A. C. D., Valençoela, R. A., Gouveia, A. 988 F., Castro, M. B. D., Lemos, R. A.A. 2013 Diseases of the nervous system of cattle in Mato Grosso do Sul, Brazil:1082 cases. Pesq. Vet. Bras., 33: 1183-1194.

Rodrigues, C. A. G., Comastri Filho, J. A. 2001. A pecuária e as pastagens do Pantanal. Corumbá: EMBRAPA Pantanal; (Artigo de divulgação na mídia, n 09). p. 3. 2001.

Schenk, M.A.M., Faria Filho, T.T., Pimentel, D.M & Thiago, L.R. L.D.S. Intoxicação por oxalatos em vacas lactantes em pastagem de sectária. Pesq. Agrop. Bras., 17: 1403-1407,1982.

Tokarnia, C.H., Brito, M.F., Barbosa, J.D., Peixoto, P.V. & Döbereiner J. Plantas Tóxicas do Brasil para animais de produção. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. 566p.

1.6 QUADRO

Quadro 1. Intoxicação experimental por oxalato em ovinos. Delineamento experimental e progressão dos sinais clínicos

	Idade (meses)	Dose			
Animal		(g/kg/PV)	Início dos SC	Duração	Progressão
ovino 1	24	1,5	imediato	30 minutos	óbito
ovino 2	48	0,5	4 horas	24 horas	recuperou-se
ovino 3	48	0,5	4 horas	28 horas	eutanásia
ovino 4	8	0,5	2 horas	6 horas	eutanásia
ovino 5	8	0,5	2 horas	20 horas	recuperou-se

1.7 FIGURAS

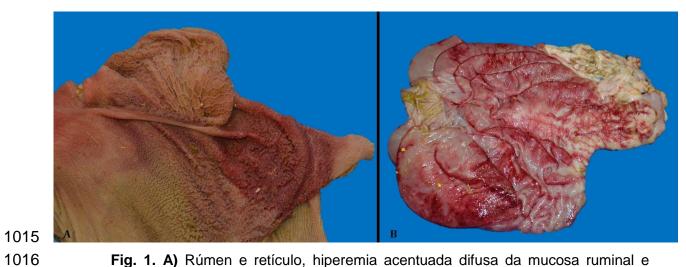


Fig. 1. A) Rúmen e retículo, hiperemia acentuada difusa da mucosa ruminal e discreta da mucosa reticular. B) Abomaso, hiperemia e edema acentuado, mais evidente nos ápices das pregas abomasais.



Fig. 2. Rim. Corte transversal evidenciando a divisão corticomedular renal (seta)

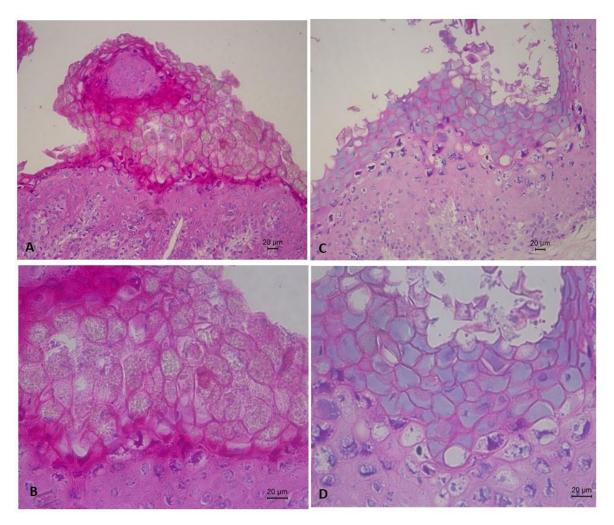


Fig. 3. Rúmen. Vacuolização citoplasmática das células epiteliais ruminais com citoplasma repleto de cristais de oxalato (setas) em 0h (A e B) e 12 h (C e D).

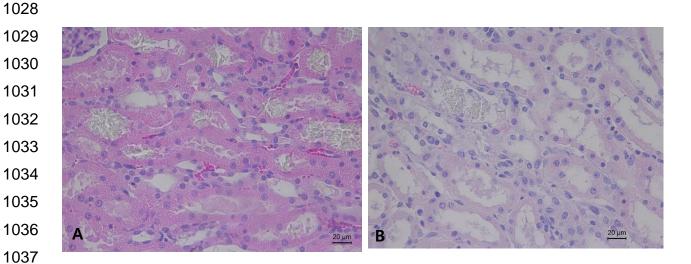


Fig. 4. Rim. A) corte de rim fixado no momento da necropsia, apresenta múltiplos túbulos degenerados e presença moderada a acentuada de cristais aciculiformes esverdeados preenchendo o seu lúmen. HE. Obj.40x. B) corte de rim

1041	fixado 12 horas após a necropsia, há evidente alteração na eosinofilia dos túbulos,
1042	e diminuição acentuada dos cristais intraluminais. HE. Obj. 40x.
1043	
1044	
1045	
1046	
1047	
1048	

CAPÍTULO 3 - ARTIGO – INTOXICAÇÃO POR *Vernonia rubricaulis* EM OVINOS



1049

1050

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon





Experimental poisoning by Vernonia rubricaulis in sheep



Kelly C.S. Godoy ^{a, *}, Paula V. Leal ^a, Marcelo A. Araújo ^b, Alda I. Souza ^b, Arnildo Pott ^c, Stephen T. Lee ^d, Claudio S.L. Barros ^b, Ricardo A.A. de Lemos ^b

- ³ Programa de Pés-graduação Em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul (UFMS), Av. Senador Felinto Muller, 2443, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil
- b FAMEZ, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil
- · Laboratório de Botânica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFMS, Cidade Universitária, S/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil
- A Poisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N., Logan, UT 84341, USA

ARTICLE IN FO

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 hafter the ingestion of V. rubricaulis. Clinical courses lasted 6-56 hafter the ingestion of the plant, Serum activities of aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transferase, and al kaline phosphatase were highly devated 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 hepatoxicosis.

© 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. mollisima (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

1051

1052

1053

Experimental poisoning by Vernonia rubricaulis in sheep

Kelly C. S. Godoy^a, Paula V. Leal^a, Marcelo A. Araújo ^b, Alda I. Souza ^bArnildo Pott^{c,} Stephen T. Lee^d, Claudio S.L. Barros^b, Ricardo A. A. de Lemos ^b

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Felinto Muller, 2443, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil.

bFAMEZ, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil

^cLaboratório de Botânica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFMS, Cidade Universitária, s/n, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^dPoisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N., Logan, UT 84341, USA

Keywords:
Sheep diseases
Poisonous plants
Vernonia rubricaulis
Acute liver failure
Hepatotoxicity

*Corresponding author.

E-mail addresses: k.c.s.godoy@gmail.com (K.C.S. Godoy)*,paulavleal@hotmail.com (P.V. Leal), marcelo.augusto@ufms.br (M.A. Araújo),aldaizabel@hotmail.com (A.I. Souza),arrivalentes.put.org (A.I. Souza),arrivalentes.put.org (S.T. Lee), claudioslbarros@uol.com.br (C.S.L. Barros),ricardo.lemos@ufms.br (R.A.A. Lemos)

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 hours after the ingestion of V. rubricaulis. Clinical courses lasted 6-56 hours 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 hepatoxicosis.

1. Introduction

Vernonia rubricaulis (family Asteraceae) is a shrub that causes high mortality rates in cattle from the Pantanal (Midwest) region of Brazil (Tokarnia 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 1,000 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 the growth of the plant inducing the development of the sprouts which are more palatable to ingestion by livestock. The lethal dose is 10-20 g/kg/body weight (bw). The onset of the clinical signs has been reported to be about 24 h after the ingestion of the plant and the clinical course ranges from 12-48 h (Tokarnia 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. mollisima (Döbereiner et al., 1976; Tokarnia et al., 1986; Gava et al., 1982) and Vernonia plantaginoides (Dutra, 2016) have been reported as toxic for livestock.

Intoxication by V. rubricaulis has been documented in cattle (Tokarnia and Döbereiner, 1982; Brum et al., 2002), however, there are anecdotal reports of spontaneous poisoning in sheep.

The aim of this paper is to determine the susceptibility, clinical signs, serum biochemistry, and gross and histopathologic lesions of sheep in order to aid veterinary practitioners in the field to diagnose this intoxication.

2. Material and Methods

The experiment was carried out with the approval of the Ethical Committee for Animal Use in Experiments (CEUA) from the Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), under the protocol CEUA-UFMS

1137 657/2015.

Eight 3-4-year-old mixed breed sheep, averaging 40 kg of weight were used in the experiment. At the beginning of the experiment, they were dewormed and identified by sequential numbers from 1-8 (Table 1). One month before the beginning of the experiment each sheep was cannulated with a permanent intraruminal cannula. During a seven-day adaptation period and throughout the experiment the eight sheep were held indoors in four 5 x 2m stalls (two sheep per stall). Water was offered ad libitum and 2% bw in dry matter consisting of corn silage and an ovine commercial ration. A clinical

For determination of the levels of the enzymes in serum of aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (AP), and blood glucose levels, sheep were bled just before the beginning of the experiment and several days thereafter.

examination was performed twice a day on each sheep.

Fresh sprouts of V. rubricaulis were fed intraruminally to the sheep in daily doses of 2, 3, 6, and 12 g/kg/bw. To test a possible accumulative effect of the plant, one sheep (Sheep 8) was fed 6 g/kg/bw divided in 3 daily doses of 2 g/kg/bw with intervals of 24 hours. Another sheep (Sheep 6) was fed 6 g/kg/bw divided into 2 daily doses of 3 g/kg/bw with intervals of 24 hours. All the other sheep were fed single doses. Sheep that died were immediately necropsied. The experimental design and results are summarized in Table 1. Liver biopsies were performed in all sheep at the D0 and in different phases of the experiment in three affected sheep, namely Sheep 5 (at D0, D4, D7, and D15), sheep 6 (D0 and D2) and Sheep 7 (at D0, D7, and D15). A biopsy was not available after D0 in the other sheep due to the acute course of the disease.

Since carboxyatractyloside (CAT) is present in other plants that cause hepatoxicosis with similar lesions to those found in V. rubricaulis poisoning (Rissi et al., 2007), chemical analysis for presence of CAT as the toxic principle of V. rubricaulis was performed. The sprouts of V. rubricaulis were collected on February 6, 2017 and June 2, 2017 in the municipality of Campo Grande, MS (S 2026'34" W 54°38'47"), air dried at room temperature and ground to pass through a 2mm screen. Xanthium strumarium burs were collected August 23, 2016 near Benson, Cache County, Utah (N 41° 48' 05" W 111° 56' 08") and air dried at ambient temperature. The seeds were removed from the bur and ground using a motor and pestle. A solution of 0.01 µg/mL carboxyatractyloside potassium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) standard was prepared in 50:50 v:v methanol:deionized distilled water

Extraction of plant material for carboxyatractyloside analysis was accomplished by weighing ground plant material (100 mg) into a screw top test tube (8 mL) equipped with Teflon lined caps (Pierce, Rockford, IL, USA). Methanol (2 mL) was added to each test tube and placed in a mechanical shaker for 16 h, then centrifuged to separate the plant residue and methanol extract. The methanol extract (0.5 mL) was transferred to a 1.5 mL autosample vial. Deionized distilled water (0.5 mL) was added to the autosample vial containing the methanol extract and mixed thoroughly.

For HPLC–MS analysis of V. rubricaulis for carboxyatractyloside, samples (10 µL) were injected onto a Betasil-C18 reversed phase column (100 x 2.1 mm i.d., 5 µm) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) protected by a guard column with the same packing material (10 x 2.1 mm i.d., 5 µm) (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). Carboxyatractyloside was eluted from the column with a 20 mM ammonium acetate-acetonitrile mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min. The mobile phase program was 20 mM ammonium acetate:acetonitrile, 95:5 v:v for 1 min followed by a linear gradient to a composition of 60:40 v:v 20 mM ammonium acetate:acetonitrile over 1 to 8 min. The mobile phase was delivered and samples injected using a 1200 series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and the column eluent was connected to the heated electrospray ion source of a VELOS PRO LTQ (Thermo Scientific) mass spectrometer operated in the positive mode with the following operating parameters; capillary temperature 275°C, source

heater temperature 300°C, sheath gas flow 40 arbitrary units, auxiliary gas flow 5 arbitrary units, source voltage 3.5 kV, source current 100 μ A. From 0-4 min. flow from the column was diverted to waste, from 4-8 min. the flow was directed to the ion source. Full scan mass data were collected for a mass range of 100 – 800 amu. Reconstructed ion chromatograms of the MH+ ion, m/z= 769, and an elution time of 7.1 min consistent with the 0.01 μ g/mL carboxyatractyloside potassium standard was used to identify carboxyatractyloside in the plant samples.

3. Results

The laboratory results are presented in Figures 1-4 and the experimental design and results are summarized in Table 1. With exception of Sheep 8, all other sheep were affected. The main clinical signs were apathy, anorexia, dry muzzle, respiratory distress, and abdominal pain. Soft feces with streaks of blood and mucus were also observed in all sheep. Sheep 1 and 6 exhibited nervous signs including muscle fasciculation, nystagmus, paddling movements, and blindness.

There was marked elevation in the serum activities of AST, GGT, and AP (Figs.1-3) in affected sheep. The glucose levels decreased from pre-experimental levels of 50 to 80 mg/dL to levels between 1.3-27 mg/dL in five sheep with clinical signs (Fig. 4).

Five sheep died and three recovered. Sheep 2 and 3 were euthanized when moribund for humane reasons.

Hepatic lesions consisting of hepatocellular centrilobular coagulative necrosis were observed in Sheep 5 and 6 at D4-D7 and D2 of the experiment, respectively. Liver enzymes in Sheep 5 were elevated on D4. Sheep 6 died on D3. Subsequent biopsies in Sheep 5 revealed that lesions subsided from D15 on, as the sheep clinically recovered and hepatic enzymes returned to normal values.

Gross lesions consisted of ecchymosis and petechiae on the serous membranes, mainly of the epicardium. The gallbladder was distended and edematous. The liver was affected in all necropsied sheep. It was increased in volume and had marked accentuation of lobular pattern with red, depressed areas intercalated with a pale-yellow network (Fig. 5). Ascites and

hydropericardium were consistent findings. Microscopically, centrilobular to submassive coagulative necrosis was observed (Fig. 6). In some instances, the hemorrhagic necrotic areas were confluent forming the so-called bridging necrosis. Coagulative necrosis was also observed in a few proximal renal tubules. Microscopic lesions were not found in any sheep in other organs. The severity of liver lesions was proportional to the size of the dose.

Carboxyatractyloside was detected in the 0.01 ug/mL carboxyatractyloside potassium standard at 5X the S/N. Carboxyatractyloside was present in the X. strumarium seeds but was not detected in the V. rubricaulis plant material.

4. Discussion

The experimental feeding of doses of 6-12/g/Kg/bw V. rubricaulis to sheep resulted in lethal hepatotoxic disease.

Hepatic lesions observed in the sheep in this experiment are typical of those derived from the action of acute-acting toxicants causing liver failure. Liver failure in the cases of the current experiment is indicated by a marked elevation in the serum activities of liver enzymes. Several toxins from plants, bacteria, fungi, insects, and drugs can cause similar lesions and clinical signs in domestic animals (Rissi et al., 2007; Tessele et al., 2012; Barros, 2016). Poisonous plants are the main cause of this type of lesion in herbivores.

The diagnosis of an acute hepatotoxicosis in these experimental cases was made based on the hepatic lesion pattern (centrilobular and submassive coagulative necrosis) which is characteristic for this type of lesion in ruminants. The results were consistent among biopsies, necropsy specimens, and the elevation of enzymes of hepatic function.

The toxin responsible for the acute hepatotoxicosis in V. rubricaulis has not been characterized. However, its action is similar to many other acute toxins, mainly phytotoxins that are recognized as a cause of acute liver failure in farm animals. The acute centrilobular necrosis as seen in the current cases is not specific for any of these acute hepatotoxins but occurs in a similar fashion for all hepatotoxins (Rissi et al., 2007; Barros, 2016). In general, hepatotoxins that go through biotransformation tend to exert their effect on hepatocytes from Zone 3 – the center of the lobule (Barros, 2016). The reason

the center of the lobule is more vulnerable to a toxic insult as compared with hepatocytes located peripherally (Zone 1) is that hepatocytes in this region may have more abundant enzymes that transform liposoluble compounds in toxic substances and because centrilobular hepatocytes have lower levels of oxygen and glutathione peroxidase (Barros, 2016). Other hepatotoxins that do not need biotransformation to exert their damage - the so-called "directaction hepatotoxins "- tend to act on hepatocytes of the lobular periphery (zone 1) due to the proximity of these periportal hepatocytes to the blood carrying the toxin and arriving in branches of the portal vein and hepatic artery (Barros, 2016). The different designations given to these acute hepatic lesions such as centrilobular, centrilobular to midzonal and massive refer to the degree of lesion severity. For example, a larger dose of V. rubricaulis can cause massive liver necrosis while smaller ones will cause necrosis restricted to the centrilobular areas of the lobule (centrilobular necrosis). This was the case in our sheep. Furthermore, strictly speaking, "centrilobular to midzonal" is a misnomer since midzonal is a band of hepatocellular necrosis restricted to the midzonal area (zone 2) of the liver, thus not affecting the centrilobular area and is rarely described in animals (Brown et al., 2017).

The sheep of this report had clearly observable neurological signs, including incoordination and opisthotonus. Neurological signs associated with acute hepatic lesions are associated with hepatic encephalopathy. However, no brain lesions were detected microscopically. In our experience, we see lesions of hepatic encephalopathy in ruminants that die from chronic hepatic failure. They consist of oval or elongate vacuoles (5-40 mm in diameter) mainly located in the interface of the gray-white matter. These vacuoles result from intra-myelinic oedema (Barros et al., 2006).

Recently, changes in astrocytes such as Alzheimer type II transformation was described in association with acute liver failure in cattle (Wouters et al., 2017). We failed to detect similar lesions in the brain of our sheep. The affected sheep of this experiment also developed hypoglycemia, and this could explain the neurological signs. However, hypoglycemic brain damage causes neuronal necrosis (red neurons) usually involving cerebral cortex, the hippocampus and the caudate nucleus (Vinters and Kleinschmidt-

Demasters, 2008); these lesions were absent in the brains of the sheep from the current experiment.

Clinical signs, gross and histopathological findings in the sheep of the current experiment were similar to those reported for X. strumarium, poisoning, therefore V. rubricaulis samples were analyzed by HPLC-MS for the presence of carboxyatractyloside, the reported toxin in X. strumarium (Cole et al., 1980; Rissi et al., 2007). While carboxyatractyloside was detected in X. strumarium seeds, it was not detected in the V. rubricaulis plant samples. This tentatively, excludes carboxyatractyloside as the toxic principle of V. rubricaulis. The hepatotoxic principle of V. rubricaulis remains unknown. Several other cytotoxic substances were isolated from other related species of Vernonia spp (Ndhlala et al., 2013; Toyang and Verpoorte, 2013). These include sesquiterpene lactones from V. nudiflora and V. mollissima (Babalola et al., 2001; Catalan et al., 1986), but only a limited number of those were evaluated for toxic activity, and the toxic principle/s were not determined. Hepatotoxicity caused by extracts of V. amygdalina (Ndhlala et al., 2013) and V. colorata (ljeh and Onyechi, 2010) are reported in mice and in rats, respectively. Interestingly, the terpenoid fraction of Vernonia spp. seems to protect rats from the hepatotoxicity of acetaminophen and carbon tetrachloride (Babalola et al., 2001; Ekam et al., 2012) although the hepatic enzymes increase with time (Ojiako and Nwanjo, 2006). This seems to indicate that when consumed in large quantities, Vernonia spp. may cause liver lesions.

Management options to reduce poisoning in livestock are limited because the plant is difficult to control. Areas where large amounts of Vernonia spp. exist on pastures should be excluded from livestock grazing during and just after the rainy season.

1323

1324

1325

1326

1327

1328

1296

1297

1298

1299

1300

1301

1302

1303

1304

1305

1306

1307

1308

1309

1310

1311

1312

1313

1314

1315

1316

1317

1318

1319

1320

1321

1322

Acknowledgments

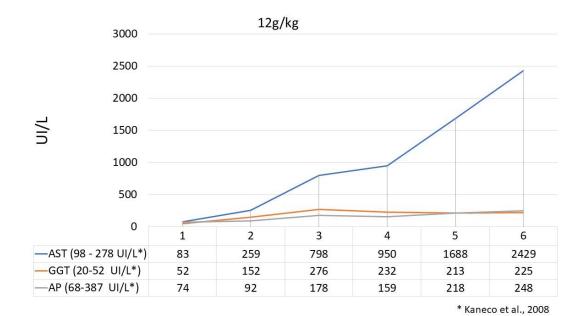
This work was funded by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia (FUNDECT) do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/CNPq - Grant 15/2014 - PRONEM -MS - Grant 59/300.126/2015). And by the FUNDECT do Estado de Mato Grosso do Sul

1329	(FUNDECT/CAPES no. 05/2014 - PVMS - 59/300.032/2015). The authors
1330	K.C.S. Godoy and P.V. Leal are funded by fellowship from FUNDECT
1331	(Nº8/2015 e Nº3/2017).
1332	
1333	Conflicts of interest
1334	The authors declare that there are no conflicts of interest.
1335	
1336	5. References
1337	Babalola, O.O., Anetor, J.I., Adeniyi, F.A., 2001. Amelioration of
1338	carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by terpenoid extract from leaves
1339	of Vernonia amydgalina. Afr. J. Med. Med. Sci. 30, 91-93.
1340	
1341	Barros, C.S.L., Driemeier, D., Dutra, I.S., Lemos R.A.A., 2006.
1342	Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil: Coleção Vallée. AGNS,
1343	São Paulo. P.207.
1344	
1345	Barros, C.S.L., 2016. Tóxicos exógenos com ação sobre o fígado. In:
1346	Santos, R.L., Alessi, A.C. (Eds.), Patologia Veterinária, second ed. São
1347	Paulo, Roca, pp.249-261.
1348	
1349	Brown, D.L, Wettere, A.J.V., Cullen, J.M., 2017. Necrosis and
1350	apotosis, 421-461. In: Zachary J.F. (Ed.) Pathologic Basis of Veterinary
1351	Disease, sixth ed. St Louis, Elsevier.
1352	
1353	Brum, K.B., Purisco, E., Lemos, R.A., Riet-Correa, F., 2002.
1354	Intoxication by Vernonia rubricaulis in cattle in Mato Grosso do Sul. Pesq.
1355	Vet. Bras. 22, 119-128.
1356	
1357	Catalan, C.A., Iglesias, D.I., Kavka, J., Sosa, V.E., Herz, W., 1986.
1358	Sesquiterpene lactones and other constituents of Vernonia mollissima and
1359	Vernonia squamulosa. J. Nat. Prod. 49, 351-353.
1360	

1361	Cole, R.J., Stuart, B.P., Lansden, J.A., Cox, R.H., 1980. Isolation and
1362	redefinition of the toxic agent from cocklebur (Xanthium strumarium). J. Agric.
1363	Food Chem. 28, 1330-1332.
1364	
1365	Döbereiner, J., Tokarnia, C.H., Purisco, E., 1976. Vernonia mollissima,
1366	planta tóxica responsável por mortandades de bovinos no sul de Mato
1367	Grosso. Pesq. Agropec. Bras. 11, 49-58.
1368	
1369	Dutra, F., Romero, A., Quinteros, C., Araújo, R., 2016. Poisoning of
1370	sheep by Vernonia plantaginoides (Less.) Hieron in Uruguay J. Vet. Diagn.
1371	Invest. 28, 392-398.
1372	
1373	Ekam, V.S., Johnson, J.T., Dasofunjo, K., Odey, M.O, Anyahara, S.E.,
1374	2012. Total protein, albumin and globulin levels following the administration
1375	of activity directed fractions of Vernonia amygdalina during acetaminophen
1376	induced hepatotoxicity in Wistar rats. Ann. Biol Res. 3, 5590-5594.
1377	
1378	Gava, A., Peixoto, P.V., Tokarnia, C.H., 1987. Intoxicação
1379	experimental por Vernonia molíssima (Compositae) em ovinos e bovinos.
1380	Pesq. Vet. Bras. 7, 33-41.
1381	
1382	ljeh, I.I., Onyechi, O., 2010. Biochemical and histopathological
1383	changes in liver of albino rats fed diets incorporated with Vernonia
1384	amygdalina and Vernonia colorata leaves. Int. J. Med. Med. Sc. 2, 285–289.
1385	
1386	Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 2008. Clinical Biochemistry of
1387	Domestic Animals, sixth ed. Academic Press, San Diego, pp. 882-884.
1388	
1389	Ndhlala, A.R., Ncube, B., Okem, A., Mulaudzi, R.B., Van Staden, J.,
1390	2013. Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. Food
1391	Chem. Toxicol. 62, 609-621.
1392	

1393	Ojiako, O.A., Nwanjo, H.U., 2006. Is Vernonia amygdalina hepatotoxic
1394	or hepatoprotective? Response from biochemical and toxicity studies in rats.
1395	Afr. J Biotechnol. 5, 1648–1651.
1396	
1397	Rissi, D.R., Driemeier, D., Silva, M.C., Barros, R.R., Barros C.S.L.,
1398	2007. Poisonous plants producing acute hepatic disease in Brazilian cattle,
1399	72-76. In: Panter, K.E., Wierenga, T.L., Pfister, J.A. (Eds), Poisonous Plants:
1400	Global research and solutions. CAB International, Wallingford, UK.
1401	
1402	Tessele, B., Brum, J.S., Schild, A.L., Soares, M.P., Barros, C.S., 2012.
1403	Sawfly larval poisoning in cattle: Report on new outbreaks and brief review of
1404	the literature. Pesq. Vet. Bras. 32, 1095–1102.
1405	
1406	Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., Amorim, P.R., Gava, A., Consorte,
1407	L.B., 1986. Intoxicação experimental por Vernonia molíssima (Compositae)
1408	em coelhos. Pesq. Vet. Bras. 6, 5-10.
1409	
1410	Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., 1982. Intoxicação de bovinos por
1411	Vernonia rubricaulis (Compositae) em Mato Grosso. Pesq. Vet. Bras. 2, 143-
1412	147.
1413	
1414	Toyang, N.J., Verpoorte, R., 2013. A review of the medicinal potentials
1415	of plants of the genus Vernonia (Asteraceae). J. Ethnopharmacol. 146, 681-
1416	723.
1417	
1418	Vinters, H.V., Kleinschmidt-Demasters, B.K., 2008. Hypoglycemic
1419	brain damage, 99-103. In: Love S. et al. (Eds.) Greenfield's Neuropathology.
1420	Eighth edHodder Arnold, London.
1421	
1422	Wouters, A.T.B., Wouters, F., Boabaid, F.M., Watanabe, T.T.N.,
1423	Fredo, G., Varaschin, M.S., Driemeier, D., 2017. Brain lesions associated with
1424	acute toxic hepatopathy in cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 29, 287-292.
1425	

LEGEND FOR THE FIGURES



1427

1428

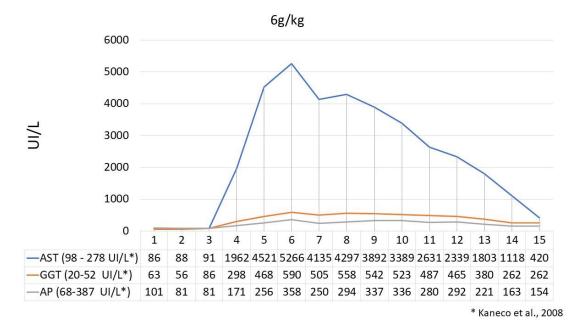
1429

1430

1431

Fig. 1 Graph representing the average values of the liver enzymes aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and alkaline phosphatase (AP) for three affected sheep fed 12 g/kg/body weight of the fresh sprouts of Vernonia rubricaulis. Numbers express UI/L. The reference values are in the line at the bottom of the graph.

1432 1433



1434 1435

Fig. 2 Graph representing the average values of the liver enzymes aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and alkaline

phosphatase (AP) for three affected sheep fed 6 g/kg/body weight of the fresh sprouts of Vernonia rubricaulis. Numbers express UI/L. The reference values are in the line at the bottom of the graph.

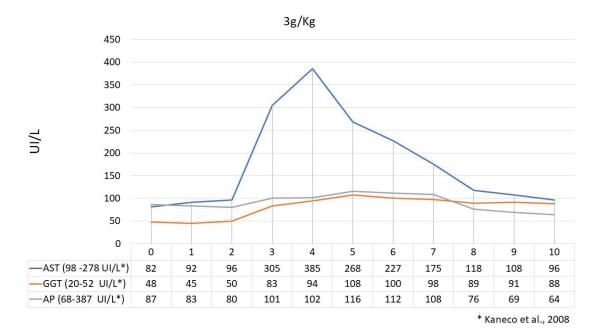
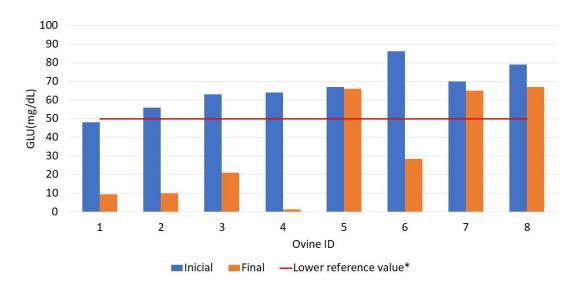


Fig. 3 Graph representing values of the liver enzymes aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and alkaline phosphatase (AF) for one affected sheep fed 3 g/kg/body weight of the fresh sprouts of Vernonia rubricaulis. Numbers express UI/L. The reference values are in the line at the bottom of the graph.



* Kaneco et al., 2008

Fig. 4 Graph representing the blood glucose values in the eight sheep of the experiment in the start and final phases of the experiment.

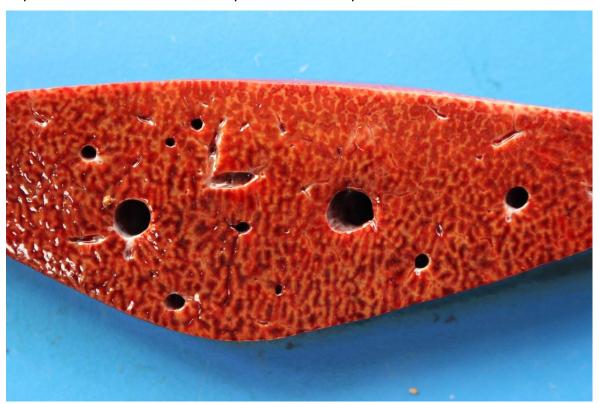


Fig. 5 Experimental poisoning by *Vernonia rubricaulis* in sheep. Liver from affected sheep. The accentuation of the lobular pattern is better appreciated at the cut surface where red, depressed areas appear intercalated with a pale-yellow network.

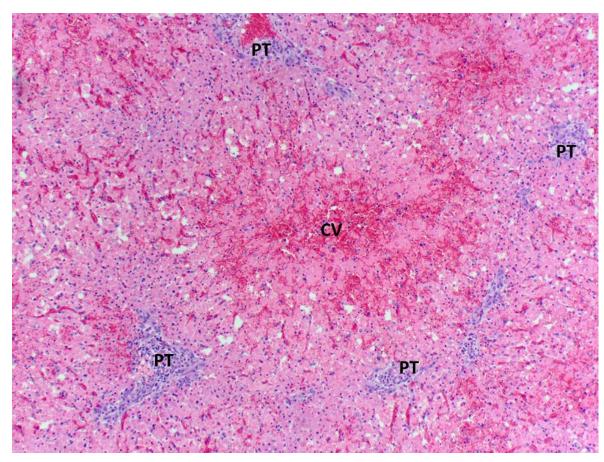


Fig. 6 Experimental poisoning by *Vernonia rubricaulis* in sheep. The microscopic aspect of the liver. Massive coagulative necrosis is observed at the center of the lobule. CV =centrilobular vein; PT = portal triad.

Table 1 Experimental design and results.

^a Fed more mature sprouts.

Shee	Pp Dose	Onset of clinical signs (hours after feeding the plant)		Outcome
1	12 g/kg/bw	6	6	Died spontaneously
2	12 g/kg/bw	8	6	Euthanized
3	12 g/kg/bw	6	6	Euthanized
4	6 g/kg/bw	48	14	Died spontaneously
5 ^a	6 g/kg/bw	48	48	Survived
6	6 g/kg/bw (two daily doses of 3 g/kg/bw)	48	56	Euthanized
7	3 g/kg/bw	48	24	Survived
8	6 g/kg/bw (three daily doses of 2 g/kg/bw)	No clinical sig	No clinical signs	Survived

1464	CAPÍTULO 4 - ARTIGO - Encefalopatia hepática secundária a
1465	lesões hepáticas crônicas causadas por Crotalaria incana em
1466	bovino
1467	RELATO DE CASO
1468	
1469	Artigo encaminhado e aceito para publicação pela revista Acta Scientiae
1470	Veterinariae -I SSN 1679-9216 (Online)
1471	Indexed in: ISI Web of Knowledge / CAB International/ Index Veterinarius /
1472	Veterinary Bulletin / LAPTOC
1473	Qualis B1- Capes – Área de Medicina Veterinária
1474	CASE REPORT
1475	Hepatic Encephalopathy Secondary to Chronic Liver
1476	Lesions Caused by Crotalaria incana in a Bovine
1477	Encefalopatia Hepática Secundária à Intoxicação por Crotalaria
1478	incana em bovino
1479	
1480	Paula Velozo Leal ¹ Gleice Kelli Ayardes de Melo ¹ , Arnildo Pott ² ,
1481	Tessie Beck Martins ³ , Dale Gardner ⁴ , Claudio Severo Lombardo de
1482	Barros ³ & Ricardo Antônio Amaral de Lemos ³
1483	
1484	¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade
1485	de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato
1486	Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil. ² Laboratório de Botânica,
1487	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFMS, Brazil.
1488	³ Laboratório de Anatomia Patológica, FAMEZ, UFMS, Campo Grande, MS,
1489	Brasil. ⁴ Poisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research
1490	Service, United States Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N., Logan,
1491	UT 84341, USA. CORRESPONDENCE: P.V.Leal [: Tel.: +55 (67) 3345-
1492	1635]. Laboratório de Anatomia Patológica, FAMEZ, UFMS, Av. Filinto Miller
1493	2443, Bairro Ipiranga, CEP 7079-900, Campo Grande, MS, Brazil.
1494	

ABSTRACT

1519

1520

1521

1522

1523

1524

1525

1526

1527

1528

Background: Crotalaria spp. Poisoning induces liver or pulmonary disease. C. mucronata, C. juncea, C. spectabilis, and C. retusa are the Crotalaria spp. inducing spontaneous intoxication in livestock in Brazil. C. mucronata and C. juncea are associated with interstitial pneumonia, while C. retusa and C. specatabilis induce hepatotoxicosis. The toxic principle in Crotalaria spp. are dehydropyrrolizidine alkaloids and their N-oxides. C. incana poisoning to livestock is rarely documented. This paper reports the clinical signs and pathological findings of a case of Crotalaria incana poisoning in a steer. The chemical finding of a potential toxic dehydropyrrolizidine alkaloid in the plant is documented for the first time.

Case. The affected bovine was part of a herd of 80 two-year-old steers that were transferred from Property 1 to Property 2, 30 days prior to the event. In the pasture of Property I – where the steers were held for 6 months – there was a heavy infestation by a Crotalaria species with signs of being consumed by the steers. The plant was identified as Crotalaria incana at the Botanical Laboratory of the Federal University of Mato Grosso do Sul and a voucher specimen was filed there under the register GCMS 51169. Two days after entering Property 2 one of the steers became depressed, staggering, and in poor body condition. With time, the steer became oblivious to the environment and died 20 days after the onset of the clinical signs. Significant necropsy findings were limited to the liver which was markedly enlarged and with rounded edges. The hepatic cut surface was mottled with dark red and extensive orange areas of discoloration. The gallbladder was distended and the bile was inspissated. Microscopically, in the liver, there was fibrosis, bile duct hyperplasia and hepatocellular megalocytosis. The Glisson's capsule was markedly thickened by fibrosis. In the brain, there was vacuolation of myelin sheaths (status spongiosus), moderate gliosis, and rare Alzheimer type 2 astrocytes.

Discussion. The diagnosis of intoxication by *C. incana* was based on clinical signs and pathological changes and the evidence of the plant being consumed. The high infestation of *C. incana* in the pasture, the high proportion of dead matter and the low concentration of viable pasture favored the ingestion of *C. incana*. Spongy degeneration, a typical lesion of hepatic

encephalopathy, was observed in the several areas of the brain. Cirrhosis of the liver as seen in the case of this report, results in elevated ammonia levels in the blood - and eventually in the brain - and ammonia toxicity causes hepatic encephalopathy. Morphological changes in hepatic encephalopathy in the central nervous system of human beings and horses centers on astrocytes which undergo Alzheimer type 2 change developing an enlarged, pale nuclei with a rim of chromatin and prominent nucleoli. Astrocytes pairs and triplets are seen, and, in severe cases, astrocytic nuclei may become lobulated and contain glycogen. Chemical analysis of C. incana was accomplished by acid-base extraction with zinc1 reduction of N-oxides and quantitation by spectrometry.2 Quantitative analysis was achieved by liquid chromatography-mass spectrometry². To confirm the identity of the alkaloid in the sample of *C. incana* the isolated alkaloid was compared to a standard sample of usaramine previously isolated, and its identity verified by magnetic resonance spectroscopy analysis. The 1,2-dehydropyrrolizidine alkaloid usaramine, as well as its N-oxide, were identified as the major alkaloids in in C. incana. The concentration found in the seed was consistent with that previously reported. This is a new finding on the toxic principle of *C. incana*.

Keywords: cattle diseases, poisonous plants, pathology, hepatotoxicity, *Crotalaria incana*, chronic liver failure

INTRODUCTION

There are several *Crotalaria* spp. distributed worldwide; most are poisonous for livestock, inducing liver or pulmonary disease [6,17]. *C. mucronata*, *C. juncea*, *C. spectabilis*, and *C. retusa* are the *Crotalaria* spp. causes intoxication in livestock in Brazil [16]. *C. mucronata* and *C. juncea* are associated with interstitial pneumonia, while *C. retusa* and *C. specatabilis* with hepatotoxicosis [16]. The toxic principle in *Crotalaria* spp. are dehydropyrrolizidine alkaloids. dehydropyrrolizidine and their *N*-oxides are present in plant families [16]. The hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids derivatives are esters of 1-hydroxymethyl-1,2-dihydro-7-hydroxypyrrolizidine. Requirements for toxicity appear to include the 1-2 unsaturation (dehydropyrrolizidine) and the esterification with a branched-chain acid. These dehydropyrrolizidines are metabolized by Cytochrome P450 enzymes

in the liver to the corresponding "pyrrole type esters", responsible for dehydropyrrolizidine-induced toxicity [14]. dehydropyrrolizidine-induced hepatotoxicity, which has long been recognized, can be acute or – more often - chronic lesions [12]. The chronic lesions consist of fibrosis, megalocytosis, and bile duct proliferation [3]. Impaired function of the liver leads to elevated ammonia levels in the blood and eventually in the brain, resulting in a

neurological syndrome referred to as hepatic encephalopathy [8,9].

C. incana poisoning to livestock is rarely documented [15]. We report here the clinical signs and pathological findings of a case of *C. incana* poisoning in a bovine and the chemical the finding of a potential toxic dehydropyrrolizidine in the plant.

CASE

Clinical and epidemiological data were collected during and on-site visits to the properties involved with these cases since the cattle had been moved from an extensive grazing system (Property 1) to a feedlot (Property 2). To determine the proportion of the various morphological components that constitute the pasture at Property 1, samples were collected through a method using a 0.5 m² metallic square. This metallic square was placed on ten different random points of the pasture, and the vegetation was collected from each of these ten points. The samples from each square were weighted, and the specimens were separated based on their morphology. The separated parts were then weighted, and each component of the pasture was calculated.

A *Crotalaria* species was identified as one of the components of the pasture and specimens of the plant were sent for identification at Botanical Laboratory of the Federal University of Mato Grosso do Sul. It was identified as *Crotalaria incana* (Figure 1), and a voucher specimen was filed there under the register GCMS 51169.

Chemical analysis of *C. incana* was accomplished by acid-base extraction with zinc¹ reduction of *N*-oxides and quantitation by liquid chromatography-mass spectrometry^{2.} A measured amount of ground plant (2.0 g) was extracted with 40 mL of methanol for 16 hrs. In duplicate, a 2.0 mL aliquot of each extract was placed into an 8 mL vial and evaporated to

dryness under nitrogen flow. 2.0 mL of 0.05 M sulfuric acid was added and powdered Zn (added to set 1 only) and the solutions allowed to mix for 30 min. The samples were centrifuged and a 1.0 mL of the upper acid layer was added to preconditioned Strata SCX3⁵ (200 mg; pre-rinsed with 3 mL methanol³ and 3 mL water) solid phase extraction columns. The samples were loaded onto the column under vaccum and then rinsed with 3 mL water and 3 mL methanol. The alkaloid fraction was eluted with 4 mL of ammoniated methanol³ (a 1/10 dilution in methanol of ammonia saturated methanol¹, evaporated to dryness and then taken backup in 1.0 mL 50% methanol (water). A 0.05 mL aliquot was diluted into 1.0 mL of 50% methanol¹ for liquid chromatography-mass spectrometry.² A set of calibration standards were prepared with usaramine standard (from the collection of standards at the Poisonous Plant Research Laboratory) to give known concentration at 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.156, and 0.039 μg/mL.

Quantitative analysis by liquid chromatography-mass spectrometry² was achieved using a Thermo Fisher Velos LTQ spectrometer4, an Agilent high-performance liquid chromatography binary autosampler² and a Synergi Hydro (Phenomenex, 150 x 2.0 mm) highperformance liquid chromatography column⁵ and guard column of equivalent solid phase. Separation was achieved using a linear gradient of acetonitrile¹ (A) and 0.1% formic acid (B)¹ at flow rate of 0.400 mL/min. Gradient conditions were 3% (A) (0-2 min); 3% A increased to 70% A (2-15 min); 70% A decreased to 3% A (15-18 min); and 3% A (18-26 min). The mass spectrometer was operated in a dual scan mode with an initial full scan MS (200 - 800 m/z) segment followed by a secondary MS/MS scan (relative collision energy of 32) of the most abundant ion from the first scan. Peak areas for quantitation of usaramine were obtained from reconstructed ion chromatograms from the full scan MS data for the protonated molecule at m/z 352.

To confirm the identity of alkaloid in the sample of *C. incana* the isolated alkaloid was compared to a standard sample of usaramine previously isolated, and its identity verified by nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis [13], and found to have the identical retention time and mass spectrum from both the above described liquid chromatography-mass

 spectrometry method and by a separate gas chromatography—mass spectrometry method [7] to that of usaramine.

Chemical analysis of *C. incana* identified usaramine and usaramine *N*-oxide (Figure. 2) as the major pyrrolizidine alkaloids. Concentration of the alkaloids ranged from 10 μ g/g in the leaf material to 870 μ g/g in the seed. The *N*-oxide accounted for 40% of the alkaloid in the leaf and 10% in the seed. The chaff (seed pod minus the seeds) contained 220 μ g/g total alkalid with 22% as the *N*-oxide.

The case occurred on June 2015 in Jaraguari County, Mato Grosso do Sul, Brazil (Latitude 20°08'30"S Longitude 54°23'58"W). The affected steer was part of a herd of 80 two-year-old steers that were transferred 30 days ago from Property 1 to Property 2. Heavy presence of *C. incana* with signs of being consumed by the steers, was observed in a 258 ha pasture of Property 1 where 88 steers (0.34 steers per ha) were held for 6 months in continuous grazing. The pasture consisted of 53.9% of *Brachiaria humidicola* (5.6% accounted for the leaves, 1% for the stem, and 45.6% of dead organic matter) and 46.1% of *C. incana*.

Two days after entering Property 2 one of the steers was observed staggering, depressed and with loss of weight. Fifteen days after the onset of the disease the clinical signs deteriorate. For the next 15 days, the steer stayed in sternal recumbency, oblivious to the environment and with the head turned and touching the thoracic cavity and eventually died 20 days after the onset of the clinical signs and was necropsied.

Significant necropsy findings were limited to the liver which was markedly enlarged and with rounded edges. The Glisson's capsule was thickened by focally extensive fibrotic areas. The hepatic cut surface was mottled with dark red parenchyma intercalated by extensive orange colored and markedly firm areas (Figure 3). Gallbladder was distended and the bile was inspissated.

Microscopically, the liver had the periportal parenchyma partially obliterated by fibrotic connective tissue with extended to other portal triads (bridging fibrosis) (Figure 4). There was bile duct hyperplasia but occasionally the bile ducts were obliterated by fibrosis. Surviving hepatocytes were vacuolated (fatty degeneration) and extensive cholestasis was apparent

(Figure 5). Moderate hepatocellular megalocytosis and bi-nucleated hepatocytes were observed. The Glisson's capsule was markedly thickened by fibrosis

In the brain, there was vacuolation of myelin sheaths (status spongiosus) observed mainly in the brain stem and at the junction of the cerebral grey matter and subcortical white matter of the frontal, parietal and occipital telencephalon, and basal ganglia (Figure. 6). Additionally, there were moderate gliosis and rare Alzheimer type 2 astrocytes.

DISCUSSION

The diagnosis of intoxication by *C. incana* in the steer of this report was based on clinical signs and pathological changes. Those are similar to the ones describe in the poisonings in cattle with this [15] and other [2,6] species of *Crotalaria*. The evidence of the plant being consumed by the steers is also indicative. The chronic characteristics of the lesions and the fact the onset of clinical signs occurred only two days after the introduction of the steers in Property 2 indicate that the intoxication happened by the consumption of *C. incana* while steers were grazing in Property 1.

The high infestation of *C. incana* in the pasture, the high proportion of dead matter and the low concentration of viable leaves of *B. humidicola* most likely favored the ingestion of *C. incana*. The percentage of steer per ha was 0.34 which is lower than those reported elsewhere for poisoning by *C. incana* [15] and by *C. mucronate* [16] which were 0.92 and 13.45 respectively. This latter fact might explain why just one steer died in the situation currently reported.

Spongy degeneration, a typical lesion of hepatic encephalopathy, was observed in the brain of the bovine of this report. It was more severe in cerebellar peduncles, mesencephalon, thalamus, and pons as is previously recorded for ruminants [9]. Morphological changes in hepatic encephalopathy in the central nervous system of human beings and horses centers on astrocytes [5,8] which undergo Alzheimer type 2 change developing an enlarged, pale nuclei with a rim of chromatin and prominent nucleoli. Astrocytes pairs and triplets are seen, and, in severe cases, astrocytic nuclei may become lobulated and contain glycogen [8]. Cirrhosis of the liver as seen

in the case of this report, results in elevated ammonia levels in the blood –
and eventually in the brain – and ammonia toxicity which is the leading
hypothesis for the causation of hepatic encephalopathy [8]. An astrocytic
phenotype similar to Alzheimer type 2 changes can be induced by
hyperammonemia in experimental animals and tissue culture and is also seen
in human patients with congenital hyperammonemia due to inherited
disorders involved in the urea cycle [4].

disorders involved in the urea cycle [4].

Morphological findings in ruminants with hepatic encephalopathy are characterized by microcavitation of the white matter in the brain, the so-called status spongiosus or spongy degeneration [8]. The spongy change is due to intramyelinic edema, causing splitting and vacuolation of myelin sheaths [8] and should be differentiated from a primary disease of the central nervous

The 1,2-dehydropyrrolizidine alkaloid usaramine, as well as the *N*-oxide, were identified as the major alkaloids in the collected plant material and is consistent with previous findings of this alkaloid in *C. incana* [1,10]. *C. incana* has also been reported to contain the alkaloids integerrimine [1] and anacrotine [11] neither of which could be identified as present in this collection of *C. incana*. The concentration found in the seed (870 μ g/g) was consistent with that previously reported of 700 μ g/g [17]. Usaramine is structurally a macrocyclic diester of retronecine and therefore is predicted to be among the group of most toxic dehydropyrrolizidine alkaloids [12].

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

MANUFACTURERS

- 1722 ¹Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA
- 1723 ²Agilent Technologies. Santa Clara, CA, USA
- 1724 ³Pharmco, Shelbyville, KY, USA

system in cattle.

- 1725 ⁴Thermo Fisher Scientific. San Jose, CA, USA
- 1726 ⁵Phenomenex, Torrance. CA, USA

Acknowledgements. This work was funded by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia (FUNDECT) do

Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/CNPq - Grant 15/2014 - PRONEM
-MS - Grant 59/ 300.126/2015). and by the FUNDECT do Estado de Mato
Grosso do Sul (FUNDECT/CAPES no. 05/2014 - PVMS - 59/300.032/2015).
P.V. Leal is funded by a fellowship from FUNDECT (Nº3/2017).
REFERENCES
1 Asres K., Sporer F. & Wink M. 2004. Patterns of pyrrolizidine
alkaloids in 12 Ethiopian Crotalaria species. Biochemical Systematics and
Ecology. 32(10): 915-930.
2 Boghossian M.R., Peixoto P.V., Brito M.F. & Tokarnia C.H. 2007.
Aspectos clínico-patológicos da intoxicação experimental pelas sementes de
Crotalaria mucronata (Fabaceae) em bovinos. Pesquisa Veterinária
Brasileira. 27(4): 149-156.
3. Bull L.B. 1955. The histological evidence of liver damage from
pyrrolizidine alkaloids: Megalocytosis of the liver and inclusion bodies.
Australian Veterinary Journal. 31(2): 33-40.
4. Butterworth R.F. 1993. Portal-systemic encephalopathy: a disorder
of neuron astrocytic metabolic trafficking. Developmental Neuroscience.
15(3-5): 313-319.
5. Crawford J.M. 2005. Fígado e trato biliar. In: Kumar V., Abbas A.K.
& Fausto N. (Eds). Robbins e Cotran Bases Patológicas das Doenças. 7.ed.
Philadelphia. Elsevier, p. 924.
6. Cullen J.M & Stalker M.J. 2016. Hepatic dysfunction. In: Maxie
M.G. (Ed). Jubb, Kennedy, and Palmer, 6.ed. Vol. 2. St. Louis, Elsevier, pp.
290-295.
7. Gardner D.R., Thorne M.S., Molyneux R.J., Pfister J.A. &
Seawright A.A. 2006. Pyrrolizidine alkaloids in Senecio madagascariensis
from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning.
Biochememical Systematics and Ecology 34(10):736-744.
8. Harris J., Chimelli L., Kril J. & Ray D. 2008. Hepatic
encephalopathy, In: Love S., Louis D.N. & Ellison D.W. (Eds), Greenfield's
Neuropathology. Vol.1. 8.ed. London, Hodder Arnold, pp. 693-694.

1761	9. Hooper P.T. 1975. Spongy degeneration in the central nervous
1762	system of domestic animals. II. Chemical analysis and vascular permeability
1763	studies. Acta Neuropathologica. 31:335-341.
1764	10. Martins C.H.Z., Cunha B.P., Solferini V.N., Trigo J.R. 2015.
1765	Feeding on host plants with different concentrations and structures of
1766	pyrrolizidine alkaloids impacts the chemical-defense effectiveness of a
1767	specialist herbivore. PLOS One 10(10):1-27.
1768	11. Mattocks A.R. 1986. In: Chemistry and toxicology of pyrrolizidine
1769	Alkaloids. London Academic, New York. p 196.
1770	12. McLean E.K. 1970. The toxic actions of pyrrolizidine (Senecio)
1771	alkaloids. Pharmacological Reviews. 33(4):429-483.
1772	13. Neto T.S.N, Gardner D., Hallwass F., Leite A.J.M., Almeida
1773	C.G., Silva L.N., Roque A.A., Bitencourt F.G., Barbosa E.G, Tasca T.,
1774	Macedo A.J., Almeida M.V. & Giordani R.B. 2016. Activity of pyrrolizidine
1775	alkaloids against biofilm formation and Trichomonas vaginalis. Biomedicine
1776	and Pharmacotherapy 83(7):323-329.
1777	14. Neuman M.G., Cohen L.B., Opris M., Nanau R. & Hyunjin J.
1778	2015. Hepatotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloids Journal of Pharmacy &
1779	Pharmaceutical Sciences. 18(4):825-843.
1780	15. Queiroz G.R., Ribeiro R.C.L., Flaiban K.K.M.C., Bracarence
1781	A.P., Lisbôa J.A.N. 2013. Intoxicação espontânea por Crotalaria incana em
1782	bovinos no norte do estado do Paraná. Semina. 34(2):823-832.
1783	16. Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V. 2002. Poisonous
1784	plants affecting livestock in Brazil. Toxicon 40(12):1635-1660.
1785	17. Williams M.C. & Molyneux R.J. 1987. Occurrence, concentration,
1786	and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in Crotalaria seeds. Weed Science
1787	35(4):476-481
1788	
1789	
1790	

LEGENDA PARA AS FIGURAS



Figure 1. Flowering specimen of *C. incana* found in Property 1.

Usaramine Usaramine Usaramine N-oxide

Figure 2. The major pyrrolizidine alkaloids identified in *Crotalaria incana* of this study were usaramine and usaramine *N*-oxide.



Figure 3 Cut surface of the liver mottled with dark red parenchyma intercalated by extensive orange colored and markedly firm areas.

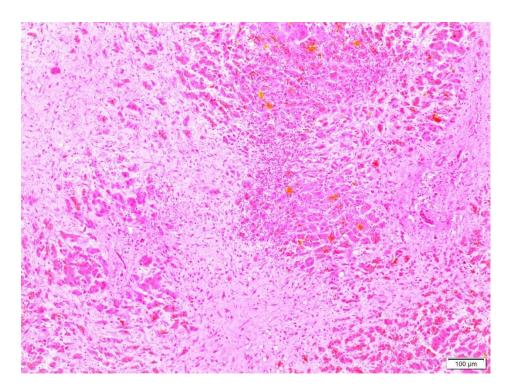


Figure 4 Extensive hepatic fibrosis.

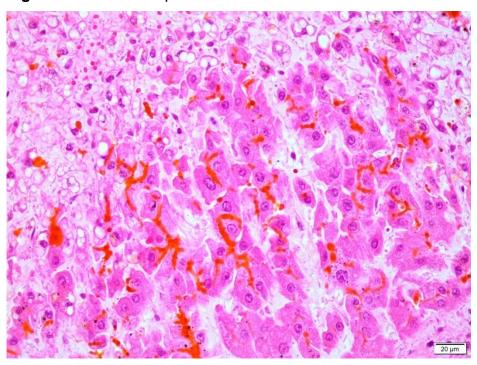


Figure 5 The hepatocytes (top left) are vacuolated (hepatic degeneration). Notice the extensive cholestasis.

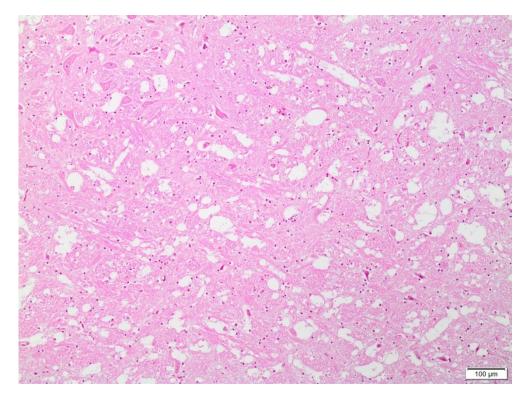


Figure 6 Brain, vacuolation of myelin sheaths (status spongiosus). This lesion was mainly found in the brain stem and at the junction of the cerebral grey matter and subcortical white matter of the frontal, parietal and occipital telencephalon, and basal ganglia.

. . . .

1819 ANEXOS

1820	PROJETO APROVADO
1821 1822	
	Eundoot
1823	runuect
1824	Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul
1825	
1826	
1827	Modelos experimentais para o estudo de princípios ativos de
1828 1829	plantas tóxicas e determinação da etiopatogenia de mortalidades em bovinos com causas não determinadas
1830	bovinos com causas nao determinadas
1831	
1832	Chamada FUNDECT/CAPES N° 03/2017 – Doutorado em
1833	Mato Grosso do Sul
1834	
1835	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
1836	
1837	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
1838	
1839	Plantas Tóxicas de Interesse Pecuário
1840	Agosto de 2017
1841	Campo Grande MS
1842	
1843	
1844	
1845	
1846	

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA DO PROBLEMA A SER ABORDADO

Prejuízos econômicos provocados por doenças são fatores limitantes para atividade pecuária de bovinos. Doenças como raiva, botulismo, infecção por BoHV-5, complexo Tristeza parasitária bovina, carbúnculo sintomático, intoxicação por plantas e produtos químicos são causas conhecidas de prejuízos devido a mortalidade de bovinos no Mato Grosso do Sul (Ribas et al 2013, Carvalho et al. 2015).

Importante mencionar que apesar do impacto econômico gerado por estas doenças, um elevado número de casos encaminhados para os serviços de diagnóstico permanece sem a determinação da causa morte. Levantamentos realizados em diferentes períodos demonstram que o número de diagnósticos inconclusivos no Laboratório de Anatomia Patológica (LAP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) supera as principais causas de morte. Nesses estudos os diagnósticos inconclusivos totalizaram 46,25% das doenças com sintomatologia neurológica (Ribas et al., 2013), 56,76% dos diagnósticos de surtos em bovinos (Souza et al., 2015) e 32,6% dos diagnósticos em ovinos(Almeida et al., 2013), respectivamente.

Frisa-se que dentre estas causas além dos diagnósticos inconclusivos existem vários diagnósticos morfológicos, os quais apesar de sugerirem uma possível etiologia, não determinamcom precisão a causa da morte. Dentre estas podemos citar a PEM, quadros de nefropatias degenerativas (provável causa tóxica), meningoencefalite não supurativa (compatível com raiva) e sugestivos de botulismo (Almeida et al 2013, Ribas et al.,2013, Souza et al., 2015). Em relação aos quadros nefrotóxicos e os confundíveis com botulismo, para a determinação de um diagnóstico preciso é fundamental determinar o papel dos oxalatos presentes na pastagem, os quais em níveis elevados podem provocar quadros clínicos patológicos semelhantes aos observados nestes levantamentos, e incluir como diagnóstico morfológico sugestivo de determinada doença. Outra possibilidade a ser testada, nos quadros nefrotóxicos causados por oxalatos, se os cristais desaparecem com tempo decorrido após a morte.

Em relação as plantas tóxicas, apesar dos avanços na determinação do diagnóstico, da epidemiologia e quadro clínico patológico desencadeado pelas

intoxicações, o conhecimento sobre os princípios tóxicos da maioria destas plantas ainda é limitado (Tokarnia et al., 2012). A principal dificuldade para a identificação do princípio tóxico é determinar dentre os vários constituintes químicos da planta qual ou quais são os responsáveis pelo quadro clínico patológico.

Uma importante planta de interesse pecuário para o estado de Mato Grosso do Sul, a *V. rubricaulis* não possui o princípio tóxico conhecido e experimentos que possam identificar e determinar sua presença nos diferentes estágios vegetativos das plantas precisam ser realizados. Diante disso é necessária a adoção de modelos experimentais com espécies animais que representem as intoxicações naturais.

Os ovinos são considerados bons modelos experimentais, pois são sensíveis à intoxicação por *Vernonia* sp., além de apresentar menor custo de aquisição, menor peso vivo dessa forma consumindo menos volumosos e concentrados e menores quantidades de amostras de planta tóxica; além disso, já foram descritos casos de intoxicação natural e experimental em ovinos por *V. plantaginoides* no Uruguai (Dutra et al., 2016).

Os aspectos anteriormente abordados resultam em sérios limitantes para o tratamento, prevenção e o controle destas doenças, pois para o controle de uma doença é necessário o conhecer sua etiologia, forma de transmissão, sinais clínicos e as lesões encontradas na necropsia e histopatologia. Além destes dados é necessário conhecer os possíveis diagnósticos diferenciais, ou seja, as doenças que podem causar quadros clínicos semelhantes. Outro aspecto relevante do ponto de vista da experimentação, é o bem-estar animal. Os modelos empregados atualmente para a reprodução da intoxicação consistem em na observação de sinais clínicos que muitas vezes coincidem com a morte do animal. Assim a validação de técnicas que identifiquem o princípio tóxico e a determinação da etiopatogenia de doenças não elucidadas permitiriam a redução da utilização de animais em experimentos posteriores, além da possibilidade da adoção de medidas de controle adequadas para o tratamento dos animais intoxicados reduzindo dessa forma os índices de mortalidade, e os prejuízos econômicos e sociais para a cadeia da produção pecuária.

Conforme o exposto acima, o diagnóstico preciso é imprescindível para a redução ou eliminação das perdas econômicas causadas por estas doenças.

Ressalta-se que as doenças a serem estudadas na presente proposta ainda possuem vários pontos obscuros que somente serão elucidados a partir de modelos e abordagens conjuntas com os estudos de casos espontâneos do campo com as reproduções experimentais.

1918

1919

1920

1921

1922

1923

1924

1925

1926

1914

1915

1916

1917

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente projeto é estudar os quadros tóxicos que ocorrem no estado do Mato Grosso do Sul, mas que não possuem quadro clínico patológico e princípios químicos completamente elucidados. Deste modo pretende-se desenvolver modelos experimentais para o estudo de princípios ativos de plantas tóxicas e determinação da etiopatogenia de mortalidades em bovinos com causas não determinadas.

19271928

2.2. Objetivos Específicos

- 1929 Caracterizar os sinais clínicos dos ovinos na intoxicação aguda por oxalato;
- 1930 Caracterizar os sinais clínicos dos animais apresentados com a ingestão
 1931 prolongada de oxalato;
- Determinar os danos renais, por meio de urinálise e marcadores de função
 glomerular e tubular renal decorrentes do consumo prolongado de oxalato e da
 intoxicação aguda;
- 1935 Avaliar os níveis de cálcio, fósforo e paratormônio decorrentes dos diferentes
 1936 períodos de consumo do oxalato;
- 1937 Identificar as lesões ósseas por meio de exames radiográficos dos animais
 1938 submetidos a consumo prolongado de oxalato;
- Descrever as alterações anatomopatológicas por meios de achados de necropsia
 dos ovinos caracterizando as lesões agudas e crônicas dos quadros de
 intoxicação por oxalatos;
- 1942 Avaliar as características histológicas do tecido renal, ósseo, nervoso e da
 1943 glândula paratireoide dos animais submetidos ao consumo de oxalato;
- Comparar as variações na composição química da planta nos diferentes estágios
 vegetativos com a ocorrência ou não de intoxicação, e por meio da comparação
 da composição identificar ou direcionar o estudo do princípio tóxico da *V. rubricaulis*.

Determinar se ovinos são modelos experimentais para quadros de intoxicação por
 V. rubricaulis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes para economia do estado de Mato Grosso do Sul que possui o quarto maior rebanho bovino do pais, aproximadamente, 21 milhões de cabeças, e ocupa o segundo lugar na produção de carne bovina com 849,062 mil toneladas (IBGE, 2015). No Estado, é importante destacar a pecuária de corte extensiva da região do Pantanal, com o município de Corumbá apresentando o segundo maior rebanho bovino do país (PPM, 2014)

Em virtude desta importância faz-se necessário o conhecimento de condições que possam limitar a produção pecuária, dentre as quais, as enfermidades que afetam o rebanho e podem causar prejuízos econômicos. O consumo de plantas tóxicas está entre as principais causas de perdas econômicas da pecuária brasileira e em Mato Grosso do Sul as mortes causadas por intoxicação fitógena correspondem a 5,8% dos diagnósticos realizados no período de 2008-2012 (Souza, 2013).

Entre os compostos tóxicos presentes em algumas plantas nativas ou cultivadas, que proporcionam prejuízos a pecuária estão os oxalatos, compostos orgânicos comuns em plantas e gramíneas tropicais como a *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens*, o *Kikuio* (*Pennisetum clandestinum*), a *Setaria asceps* cv. *Kazungula*, *Panicum maximum* cv. Colonião (Tokarnia et al., 2012).

Convém ressaltar que Mato Grosso do Sul possui na região do Pantanal, aproximadamente, 6.000 km2 de pastagens cultivadas do gênero *Brachiaria* entre elas a *Brachiaria decumbens*, a *B. brizantha* e a *B. humidicola*, distribuídas principalmente, em áreas desmatadas de cordilheiras e de campo (Rodrigues; Comastri-Filho, 2001). Essas forrageiras foram introduzidas na região do Pantanal por se adaptarem bem a solos ácidos e de baixa fertilidade, a *B. humidicola* destacou-se pela boa adaptação ao solo da região, apresentando alta produtividade, adaptação as secas prolongadas (Crispim et al. 2003), contudo, é importante destacar que

essas forrageiras possuem altas concentrações de oxalatos (Nunes et al. 1990).

Os oxalatos ocorrem sob formas solúveis e insolúveis: as formas solúveis são os oxalatos de sódio, potássio e amônia e as insolúveis são os oxalatos ácidos e oxalatos de cálcio (Savage et al., 2000; Tokarnia et al., 2012). Os oxalatos insolúveis ingeridos são excretados, sem causar prejuízos à saúde animal, entretanto, os oxalatos solúveis presentes em forrageiras possuem propriedades antinutricionais como a capacidade de reagir com microelementos como cálcio e magnésio impedindo sua absorção (Gorb et al., 1962), levando ao desequilíbrio no balanço cálcio fósforo (McKenzie et al., 1981).

Esse desequilíbrio leva a excessiva mobilização de cálcio dos ossos com consequente desmineralização óssea e sua substituição por tecido conjuntivo fibroso. Essa condição é frequente em equinos e conhecida como "cara inchada" (McKenzie et al., 1981; Tokarnia et al., 2012). Embora menos comum em ruminantes, o consumo prolongado de pastagens com elevados teores de oxalato pode resultar em hipocalcemia severa (Seawright et al., 1970) e urolitiase (McIntosh et al., 1974) com casos descritos em ovinos (El-Khodery et al., 2008).

Quando plantas ricas em oxalato são consumidas, tanto por monogástricos quanto por ruminantes, o cálcio reage com os oxalatos solúveis ingeridos no estômago dos primeiros e no pré-estômago dos segundos, formando sais insolúveis. Entretanto, ao se considerar o metabolismo do oxalato, quando ingerido por ruminantes, observa-se que pode ocorrer de quatro maneiras diferentes: 1- as bactérias ruminais podem fragmenta-los em formas não tóxicas (Alisson et al., 1985); 2- Em dietas com altas concentrações de cálcio e altos teores de oxalatos, os oxalatos presentes no rúmen e nos intestinos se combinam com o cálcio e o magnésio assumindo a forma de cristais de oxalatos, os quais são insolúveis e são excretados nas fezes, reduzindo a absorção de cálcio;3-o oxalato solúvel ingerido pode ser absorvido a partir do rúmen para o sangue e combinar-se com o cálcio sérico para formar cristais de oxalato insolúveis que podem se precipitar nos rins e causar danos a esses órgãos como obstrução das vias urinárias ou nefrose com insuficiência renal (Lincoln; Black 1980; Blaney et

al. 1982);4- os oxalatos insolúveis ingeridos podem passar pelo sistema digestivo sem causar efeitos prejudiciais ao animal (Ward et al. 1979, Tokarnia et al. 2012).

Considerados os motivos expostos percebe-se que os efeitos adversos e a intoxicação por oxalato são processos complexos, dependentes de vários fatores, dentre os quais pode- se citar a forma química do oxalato, a idade do animal, a taxa de consumo, a quantidade e a qualidade da dieta, a quantidade total de oxalato ingerido e a adaptação do animal ao conteúdo de oxalato na dieta (Rahman et al. 2013).

Apesar da capacidade das bactérias do rúmen em metabolizar os oxalatos solúveis (Davies, 1979), provavelmente, grande parte do oxalato ingerido passa intacto pelo sistema digestivo dos ruminantes (Mckenzie; Shultz, 1983), pois a maioria das bactérias do rúmen ou do intestino não são capazes de degradar o oxalato.

Os riscos de intoxicação podem ser reduzidos adaptando os ruminantes ao consumo de doses crescentes de oxalatos. Assim se os ruminantes forem expostos gradualmente a uma dieta com níveis elevados de oxalato (período superior a 4 dias) a população de bactérias capazes de degradar o oxalato presentes no rúmen se prolifera para evitar a ocorrência da intoxicação (Allisson et al., 1985; Burrows;Tyrl, 1989). Contudo, essa condição apenas se mantém pela ingestão continua de oxalatos e a taxa de degradação diminui se o consumo é interrompido (Mittal; Kummar, 2004).

Outros fatores relacionados a resistência ou susceptibilidade são: a resistência natural, idade, sexo, o estágio fisiológico e a composição da dieta dos animais (Rahman et al., 2013), como exemplo da resistência natural descreve-se diferenças a tolerância entre as espécies animais: rúmen dos caprinos é considerado um ambiente favorável para populações de bactérias que degradam o oxalato quando comparados com ovinos (Duncan et al. 1997), além disso uma quantidade importante de oxalato ingerido por ruminantes pode ser dissolvido na digestão (Libert; Franceschi, 1987), porém, equinos são incapazes de utilizar oxalatos de cálcio presentes em forrageiras tropicais (Blaney et al. 1982; Mckenzie; Shultz, 1983), enquanto que os suínos podem utilizar 80% mais oxalato de cálcio da mesma origem (Brune; Bredehorn, 1961).

Animais jovens são considerados mais sensíveis a intoxicação, mas não existem estudos comparativos com animais de diferentes idades (Rahman et al. 2013). Embora o excesso de oxalatos possa ocasionar a formação de urólitos tanto em machos quanto em fêmeas, os machos são mais suscetíveis a obstrução uretral, portanto, com manifestação clínica da urolitiase que pode culminar com o rompimento uretral (Tiruneh, 2004; Rahman et al. 2013).

Os ruminantes em lactação são mais suscetíveis do que os não lactantes, devido a excreção de cálcio pelo leite (Rahman et al. 2013), no entanto, alguns autores sugerem que animais gestantes e em lactação são mais suscetíveis do que outras categoriais (Radostits et al. 2007). Em ovinos alguns relatos descrevem que animais em lactação apresentam quadro de hipocalcemia com maior frequência que ovelhas prenhes e ovelhas não gestantes (El Khodery et al. 2008), mas estudos anteriores relataram que a hipocalcemia foi mais frequente em ovelhas prenhes, principalmente aquelas alimentadas com concentrados (Tindall, 1986; Sweeney; Cuddeford, 1987; Pickal et al., 1988).

Devido à complexidade dos fatores envolvidos no metabolismo dos oxalatos não há um consenso sobre os níveis seguros de oxalato presentes nas plantas que possam ser ingeridos pelos animais. No entanto considerase que níveis menores que 2% de oxalatos solúveis na dieta não causam intoxicação, mas podem provocar decréscimo nos níveis de cálcio. Para os não ruminantes considera-se níveis inferiores a 0,5% como níveis aceitáveis de oxalatos solúveis (Rahman et al. 2013). As plantas que provocam a intoxicação aguda ou subaguda contêm mais de 10% de ácido oxálico calculado sobre o peso da planta dessecada, porém há registro da intoxicação com gramínea contendo níveis mais baixos. A intoxicação crônica pode ocorrer por plantas contendo quantidades inferiores as citadas (1 a 4%) de ácido oxálico na matéria seca (Blaney et al. 1981, Mckenzie et al. 1981).

Em condições naturais os surtos de intoxicação aguda ou subaguda acometem bovinos e ovinos recentemente introduzidos após privação alimentar em pastagens com plantas com elevados teores de oxalatos. O quadro clínico da intoxicação aguda ou subaguda em bovinos e ovinos

2086

2087208820892090

2091 2092

20932094209520962097

209921002101

2098

2102 2103

2104 2105

2107 2108

2106

2109 2110

2111 2112

21132114

2115

caracteriza-se por depressão fraqueza, dificuldade respiratória, diminuição da motilidade do trato digestivo, andar rígido, incoordenação, tetania, tremores, convulsões, edemas subcutâneos, coma e morte (Schenk et al. 1982).

Os casos ocorrem após um curto período, as vezes de poucas horas após a introdução dos animais na pastagem (Tokarnia et al. 2012). Dessa forma, o quadro clínico-patológico da intoxicação aguda em bovinos deve ser diferenciado de outras doenças que cursam com sinais nervosos como botulismo, raiva, dentre outras (Ribas et al., 2013).

No Brasil a intoxicação aguda e subaguda por oxalato foi descrita em ovinos no Rio Grande do Sul (Ferreira et al. 1991) e caprinos na Paraíba (Galiza et al. 2011), em ambos os casos os animais ingeriram plantas descritas como ricas em oxalatos, Oxalis sp e Portulaca elatior, respectivamente. No estado de Mato Grosso do Sul a toxicose foi relatada em vacas lactantes, em mau estado nutricional, introduzidas em pastos de Setaria viridis há 10 dias, neste surto do rebanho de 85 vaca, 45 adoeceram e nove morreram (Schenk et al. 1982). Ainda são descritos casos de nefropatias tóxicas de etiologia desconhecida, mas com lesões histológicas sugestivas de intoxicação por oxalatos no Estado. Além disso, no Mato Grosso do Sul foi descrito um surto sugestivo de intoxicação por oxalato em novilhas nelores mantidas em pastagem de B. humidicola em propriedades na região do pantanal da Nhecolândia (Ribas et al., 2013), ressalta-se que essas novilhas eram criadas nestas pastagens, além desses, outros dois casos de intoxicação por oxalato em ovinos foram descritos por Almeida et al. (2013) em Mato Grosso do Sul.

Os principais achados de necropsia em surtos de intoxicação por oxalato são congestão e aumento de volume dos rins com a nítida separação entre córtex e medula, por uma linha branca resultante do acúmulo de oxalatos. Hemorragias e edema na parede do rúmen e edemas cavitários também podem ser observados. A principal alteração histológica é a presença de cristais de oxalatos nos túbulos uriníferos e também nos vasos sanguíneos da parede do rúmen e do sistema nervoso central (James 1978; Jones et al. 1977). Apesar das lesões renais serem identificadas em quadros de intoxicação por oxalato, não se encontram relatos de experimentos que

façam uma investigação detalhada destas injúrias por meio do uso de marcadores urinários como a urinálise, a razão proteína urinária: creatinina urinária (PU:CU), gama glutamiltransferase urinária (GGTu) associados a outros marcadores séricos como creatinina, fósforo, cálcio e ureia, utilizados comumente na investigação de danos renais. Os biomarcadores de injúria a esse órgão são considerados importantes métodos de diagnósticos não invasivos e poderão auxiliar na investigação das alterações clinico patológica causada pela intoxicação por oxalato.

Os efeitos adversos decorrentes da ingestão prolongada de oxalato são observados com frequência em equinos que permanecem por longos períodos em pastagens de gramíneas com altos teores de oxalatos (Puoli Filho et al., 1999; Tokarnia et al. 2012). Essa intoxicação possui o quadro clinico-patológico determinado como hiperparatireoidismo secundário que resulta em osteodistrofia fibrosa.

Os sinais clínicos, nessa espécie, iniciam com claudicação discreta, evoluem para dificuldade locomotora, aumento, característico, bilateral dos ossos maxilares superiores e mandíbulas, e com a progressão dos sinais clínicos há emagrecimento ocasionado pela dificuldade de apreensão e mastigação dos alimentos, se não realizado o tratamento há afrouxamento e queda dos dentes, dificuldade respiratória progressiva, fraturas de membros, caquexia, inanição, decúbito permanente e morte. Em equinos não foram encontrados relatos de intoxicação aguda por oxalato. Os achados de necropsia e histológicos são compatíveis com Osteodistrofia fibrosa e presença de cálculos renais, ureterais e na bexiga (Tokarnia et al. 2012).

Em ruminantes não se encontram relatos dos efeitos causados pelo consumo prolongado de oxalatos, por outro lado, ressalta-se o elevado número de bovinos com fraturas patológicas durante o manejo descrito no histórico de animais atendidos no laboratório de anatomia patológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LAP/UFMS). Dessa forma a necessidade da melhor compreensão da etiopatogenia da toxicose por oxalato em ruminantes sugere o desenvolvimento de um modelo experimental no qual possa ser observado os sinais clínicos, e investigados os tipos e a distribuição das lesões nos sistemas de órgão afetados pela intoxicação.

Para isso essa proposta visa desenvolver um modelo experimental para intoxicação aguda e efeitos adversos do consumo prolongado de oxalato utilizando ovinos, uma vez que, essa espécie é sensível a intoxicação por oxalato (Ferreira et al., 1991; Rahman et al. 2011; Almeida et al. 2013) e oferecem vantagens para realização de pesquisas em relação aos bovinos, pois, são mais fáceis de manejar e requerem menores investimentos com alimentos e infraestrutura.

Em se tratando de plantas tóxicas do MS a *Vernonia rubricaulis*é um subarbusto da família Asteraceae, sem nome popular, sendo responsável por mortandades de bovinos na região Centro-Oeste do Brasil (Brum et al., 2002, Tokarnia et al., 2012). Em um estudo retrospectivo realizado entre os anos 2000 e 2012, nos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica - LAP (FAMEZ-UFMS) observou-se que a *Vernonia rubricaulis* foi responsável pela mortalidade de bovinos em 26 surtos diagnosticados no LAP/FAMEZ, o que correspondeu a 25% das intoxicações por plantas tóxicas diagnosticadas durante o período estudado (Souza et al., 2015).

Convém ressaltar a descrição de surtos espontâneos de intoxicação em bovinos por *V. rubricaulis* (Brum et al., 2002) e intoxicações experimentais em bovinos (Tokarnia & Döbereiner, 1982, Brum et al., 2002). Outras plantas deste gênero causaram intoxicações naturais, como *V. molissima* em bovinos e ovinos (Döbereiner et al., 1976, Tokarnia et al., 2012) e, em ovinos por *V. plantaginoides* (Dutra et al., 2016). Experimentalmente, foram reproduzidos em bovinos por *V. rubricaulis* (Tokarnia&Döbereiner, 1982, Brum et al., 2002), em ovinos por *V. squarrosa* (Tokarnia&Döbereiner, 1983).

As condições de ocorrência da intoxicação por *Vernonia rubricaulis* são descritas em bovinos principalmente quando há brotação dos pastos, sobretudo depois de queimadas, na época de escassez de forragem, entre os meses de agosto a dezembro (Tokarnia et al., 2012). Alguns fatores são importantes para a ocorrência da doença, como a utilização de técnicas que favorecem a brotação da planta, incluindo o uso de roçadeira, assim como a queimada e o desmatamento, e fatores que aumentam a possibilidade de ingestão da planta, incluindo o transporte de animais, que são introduzidos

com fome ou sede, em áreas em que ocorre a brotação da planta, e a superlotação dos pastos (Brum et al., 2002, Riet-Correa & Mendez, 2007).

aguda (Tokarnia et al., 2012). Os experimentos foram realizados com as

partes aéreas, em fase de brotação das plantas, ainda frescas por via oral,

em bovinos as doses de V. rubricaulis tóxicas que causaram morte variaram

de 3 a 30 g/kg de PV(Tokarnia & Döbereiner, 1982, Brum et al., 2002). A

planta dessecada, em temperatura ambiente, parece ter perdido a

Sob condições naturais, aparentemente a planta só causa intoxicação

toxicidade, pois em doses de 27 a 30 g/kg de PV oferecido a bovinos causou apenas sintomas leves (Tokarnia & Döbereiner, 1982). A *V. mollisssima* apresentou comportamento semelhante em bovinos, doses de 10 a 30 g/kg

(Döbereiner et al., 1976).

dessecadas com doses de 20 a 30 g/kg de PV observou-se a morte dos bovinos. Um bovino intoxicado com 20 g/kg de PV conseguiu se recuperar

de PV da planta fresca causaram a morte dos animais, nas plantas

Até o momento, a profilaxia e o controle das intoxicações causadas por *Vernonia rubricaulis* são realizadas com base no conhecimento epidemiológico, geralmente, mediante eliminação da planta ou evitando o pastejo em áreas infestadas. Recomenda-se não introduzir animais com fome ou sede em áreas onde ocorre brotação da *V. rubricaulis*, principalmente, após queimadas, roçadas ou após a chuva, aconselha-se também evitar o super pastejo (Riet-Correa & Mendez, 2007). Os dados epidemiológicos evidenciam que a maioria dos animais se intoxicam entre os meses de agosto e dezembro, após o início do período de chuvas (Brum et al., 2002).

Os sinais clínicos descritos são agressividade, anorexia, focinho seco, expiração com gemidos, apatia, andar com desequilíbrio, tremores na cabeça e contrações musculares. Os animais podem permanecer alguns minutos com a cabeça encostada contra objetos ou cercas, ou fazendo movimentos laterais da cabeça, não conseguindo se alimentar ou beber. Quando em decúbito esternal, apresentam cólicas, gemidos, batem com a cabeça no chão, com movimentos de pedalagem e salivação (Tokarnia & Döbereiner, 1982, Brum et al., 2002,). Em outras espécies deste mesmo gênero os sinais clínicos são semelhantes (Döbereiner et al., 1976, Tokarnia

& Döbereiner, 1983, Riet-Correa & Mendez, 2007, Tokarnia et al., 2012). Os principais achados de necropsia na intoxicação aguda ou experimental ocorrem no fígado que, ao corte apresentamáreas vermelhoenegrecidas circundadas por áreas pálidas (Tokarnia et al., 2012). Na patologia clínica há elevação dos níveis séricos de AST (Riet-Correa & Mendez, 2007).

Sabe-se que a parte mais tóxica é a planta em brotação, diminuindo à medida que a planta cresce (Tokarnia et al., 2012). Salienta-se a importância do reconhecimento do princípio tóxico, uma vez que identificado pode-se determinar o período em que a planta se torna potencialmente mais tóxica e, as condições em que apresentam maior toxicidade e assim, eliminar a experimentação com modelos animais.

No entanto, princípio tóxico da *V. rubricaulis* e de outras espécies de Vernonia ainda é desconhecido. Existem mais de 1000 espécies registradas do gênero Vernonia, mas apenas 10% destas espécies foram catalogadas em estudos etnofarmacológicos. Nestas espécies têm sido relatadas uma infinidade de compostos bioativos. Os principais compostos isolados de diversas espécies de *Vernonia* são os terpenóides. Estes podem ser subdivididos em monoterpenos, sesquiterpenos, dipertenos, triterpenos e caratenoides. Em amostras de *V. mollissima*, o principal princípio ativo isolado foi o sesquiterpeno (Toyang & Verpoorte, 2013). Apesar do isolamento do sesquiterpeno na *V. mollissima*, não é possível associar a presença desse metabólito às intoxicações observadas nos animais de produção.

De modo geral, as plantas tóxicas têm como princípios ativos os mais diversos compostos, mas no geral, apenas um é a causa da doença. Nesse caso, existe uma dificuldade em se determinar o princípio ativo responsável pelas intoxicações (Tokarnia et al., 2012). As toxinas são metabólitos secundários das plantas, isto é, substâncias químicas que estão diretamente envolvidas no metabolismo fundamental da planta. A maioria não contribui para ganho de energia ou integridade estrutural. São extremamente diversas, apresentando uma grande variedade de tipos químicos. Por vezes, a substância tóxica para o animal não é o composto em si, mas os metabolitos resultantes de sua degradação (Lima Junior et al., 2010). Em ruminantes, está degradação é mais complexa, pois antes da absorção dos

princípios tóxicos pela mucosa do trato digestório, a microflora ruminal pode modificar sua toxicidade por processos de degradação ou conjugação das toxinas, por transformar percussores inofensivos em substâncias tóxicas, ou por converter substâncias pouco tóxicas em mais tóxicas (Lima Júnior et al., 2010, Tokarnia et al., 2012).

Estudos fitoquímicos são necessários para confirmar a presença desses terpenos na *Vernonia rubricaulis*, sabidamente tóxica aos bovinos, se estes metabólitos podem ser considerados responsáveis pelos quadros clínicos hepatotóxicos e se as concentrações tóxicas se alteram em diferentes fases vegetativas das plantas. Comparativamente plantas do gênero *Xanthium* (família Asteraceae), assim como a *Vernonia rubricaulis* causam lesões hepatotóxicas, e as intoxicações são atribuídas a um glicosídeo triterpenóide. O princípio tóxico de *Xanthium* spp se encontra em sementes e é passado para os brotos quando a semente germina. Só as plantas no estágio cotiledonário, com as duas primeiras folhas de brotação, são tóxicas e ao mesmo tempo palatáveis. À medida que essas folhas se desenvolvem, a toxicidade diminui consideravelmente (Tokarnia et a., 2012), como observado nas intoxicações por *V. rubricaulis*.

O princípio tóxico é um importante fator para o estudo da patogenia, das condições de ocorrência e consequentemente do controle de intoxicações por planta, sua identificação permite avaliar com maior precisão as quantidades dos princípios presente nas plantas administradas em condições experimentais e possibilita identificaras variações em diferentes estágios vegetativos ou a influência de variações produzidas por alterações climáticas ou de manejo. Além disso, a partir do conhecimento das quantidades tóxicas de um princípio e das suas variações nas plantas é possível por meio da dosagem deste princípio nas plantas realizar estudos e preconizar medidas de controle das intoxicações sem a necessidade da experimentação animal.

4. METODOLOGIA

4.1 MODELO EXPERIMENTAL PARA IDENTIFICAÇÃO DO PRINCÍPIO TÓXICO DE *VERNONIA RUBRICAULIS*

Serão colhidas mudas de *Vernonia* spp. em pastagens infestadas pela planta e com histórico de intoxicações essas amostras serão encaminhadas ao Campo Agrostológico (UFMS). Amostras da planta serão colhidas e encaminhadas ao Laboratório de Botânica (UFMS) para identificação da espécie e gênero da planta.

utilizada а Vernonia rubricaulis em diferentes desenvolvimento: plantas na fase de brotação (planta podada) e plantas na fase de maturação (planta sem poda). Serão preparados dois canteiros (canteiro 1 e 2) de 6x4 metros, equivalente a 24m², com mudas das plantas oriundas de propriedades com histórico de intoxicação. No canteiro 1 serão realizadas podas da planta e, após 15 dias amostras dos brotos serão colhidas. Os cortes e as coletas dos brotos serão realizadas em diferentes épocas do ano: agosto/17, outubro/17, fevereiro/18, maio/2018. Nos mesmos períodos serão coletadas no canteiro 2 amostras da planta sem poda. Folhas na fase de brotação e maturação da planta serão administradas a ovinos. Serão utilizados 12 animais por período, divididos em três grupos de quatro animais, totalizando 48 animais. Em todos os períodos serão ofertadas doses únicas de 10 g/kg de PV. O delineamento experimental está descrito na tabela 1.

23022303

2304

2305

2285

2286

2287

2288

2289

2290

2291

2292

2293

2294

2295

2296

2297

2298

2299

2300

2301

Tabela 1. Delineamento experimental do potencial tóxico de *Vernonia spp*. em ovinos

	Cantei	ro Canteir	o Controle
Grupos	1	2	
•		Número de a	nimais
1	2	2	2
2	2	2	2
3	2	2	2
4	2	2	2

2306

Canteiro 1: folhas em fase de brotação (10 g/kg de PV em dose única);

23072308

Canteiro 2: folhas maduras (10 g/kg de PV em dose única);

2309 2310

Controle: dieta controle. Composta de silagem de milho e concentrado a base de milho e soja.

Serão utilizados cordeiros desmamados, com peso médio de 20±2,0 kg. Todos identificados com códigos números, avaliados clinicamente e amostras de fezes serão coletadas para acompanhamento parasitológico por meio de análises de ovos por grama de fezes –OPG – (Gondon & Whitlock, 1939). Animais com OPG igual ou acima de 500 serão desverminados. Diariamente, os cordeiros receberão 200 gramas de concentrado, 30 gramas de suplementação mineral e silagem de milho à vontade. Os animais terão acesso à água à vontade.

Para efeitos comparativos, será utilizado um grupo controle para avaliação das mudanças de sinais clínicos e evolução da doença.

As amostras das folhas na fase de brotação e folhas maduras de *Vernonia rubricaulis* serão encaminhadas ao laboratório de química para identificação do princípio tóxico e suas diferentes concentrações nas diferentes fases de desenvolvimento da planta, através do detector por espalhamento de luz evaporativo (ELSD) acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência. Após leitura, serão comparados o perfil das amostras presentes nas folhas em brotação, com as amostras presentes nas folhas maduras, e assim, se procurará o princípio tóxico nas substâncias presentes e ausentes na outra, principalmente se estes forem substâncias já conhecidas.

4.2 MODELO EXPERIMENTAL PARA INDUÇÃO DA INTOXICAÇÃO AGUDA E CRÔNICA POR OXALATO EM RUMINANTES

4.2.1 - Modelo experimental para indução da intoxicação aguda em ovinos utilizando oxalato de Amônia.

O estudo será realizado com 8 ovinos, provenientes de áreas sem a ocorrência da intoxicação por oxalato, sem raça definida, machos com 06 a 12 meses de idade e pesos entre 20 e 35 kg, previamente vermifugados. Os animais serão identificados individualmente e seis receberão 550 mg/kg de peso vivo de oxalato de amônia dissolvido em 10 ml de água destilada conforme descrito por James et al. (1971) e dois serão utilizados como controle negativo.

Os animais serão mantidos em baias individuais com área de 2,0 m², alimentados com ração comercial balanceada para a espécie (equivalente a 1% do PV), água à vontade. Os ovinos serão submetidos a exame físico antes da administração do princípio tóxico, com realização de novo exame clínico se os animais apresentarem sinais clínicos da intoxicação. Serão avaliadas alterações

de comportamento, de coloração de mucosas, dos movimentos respiratórios, ruminais e temperatura.

Serão colhidos 10 ml de sangue antes da administração do oxalato e a cada 12 horas no decorrer do experimento, as amostras serão colhidas por venopunção da jugular e acondicionadas em tubos sem anticoagulante para posterior centrifugação e separação do soro que ficará armazenado em temperatura de -80°C até a realização dos ensaios laboratoriais.

Para verificação das funções glomerulares e tubulares renal serão realizadas dosagens séricas de creatinina, ureia e fósforo, cálcio ionizado, urinálise e dosagens urinárias de gama glutamil transferase (GGT), proteína, creatinina, fósforo e cálcio com posterior determinação da relação proteína/creatinina urinária. A concentração do cálcio ionizado será calculada por meio da obtenção dos analitos séricos: cálcio total, proteína total e albumina de acordo com a seguinte fórmula: Cálcio ionizado (mg/dL) = 6 x Ca - [A + (0,19 x Pt) / 3] / A + (0,19 x Pt) + 6, onde, Ca = Cálcio mg/dL Pt = Proteínas totais (g/dL) A = Albumina (g/dL).

A mensuração dos biomarcadores séricos e urinários (GGT, cálcio e fósforo) será realizada utilizando soro e kits reagentes específicos e seguirá os protocolos disponibilizados nos kits comerciais, com leitura realizada em analisador bioquímico automático (Cobas C111- Roche®), e a proteína urinária mensurada em bioquímico semi-automático (Spectron- Celer®). Para dosagem do hormônio da paratireóide (PTH) será encaminhado soro para laboratório de referência.

Em relação da urina, as amostras serão colhidas por micção espontânea e avaliadas às características físicas serão observados: cor, odor e presença de turbidez. A avaliação física utilizará tiras reagentes para identificar possíveis alterações no pH e nas concentrações de glicose, proteína, bilirrubina, sangue oculto, cetonas e nitrito. A densidade urinária será mensurada por meio de refratometria. Na sedimentoscopia será investigada a presença de leucócitos, hemácias e cilindros.

Os ovinos que morrerem serão necropsiados imediatamente após a morte, com a coleta fragmentos dos diversos órgão, que serão fixados em formol tamponado a 10%. Após a fixação, os fragmentos serão clivados, desidratados em álcool etílico absoluto, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e cortados em micrótomo à espessura de 5µ e os cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE). Os ovinos que não manifestarem sinais clínicos ao final do experimento

serão eutanasiados e amostras dos diferentes órgãos submetidas para processamento histológico conforme descrito anteriormente.

Valores obtidos nas mensurações das variáveis serão tabulados para análise em planilha do Excel. A normalidade dos dados será verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. O teste estatístico para comparação das amostras dependentes com dados não paramétricos será pelo teste estatístico de Friedman e para distribuição normal o teste estatístico de aplicado será análise de variância (ANOVA). A correlação e a quantificação da associação entre as variáveis utilizarão a correlação de Pearson para dados numéricos contínuos e para dados ordinais o teste de correlação de Spearman. Para todas as análises os resultados serão considerados significativos quando p<0,05. O experimento será submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS.

4.2.2Segunda fase-Modelo experimental para indução da intoxicação crônica por oxalato em ovinos.

O estudo será realizado com 6 ovinos, provenientes de áreas sem a ocorrência da intoxicação por oxalato, sem raça definida, fêmeas, com 06 a 12 meses de idade e pesos entre 20 e 35 kg, previamente vermifugados. Os animais serão identificados individualmente e receberão 55 mg/kg de peso vivo de oxalato de amônia dissolvido em 10 ml de água destilada, a cada 48 horas por um período de 180 dias através de cânulas ruminais ou até a manifestação dos sinais clínicos do consumo prolongado do oxalato.

Os animais serão mantidos em baias individuais com área de 2,0 m², alimentados com ração comercial para a espécie (equivalente a 1% do PV), com feno de tifton e água à vontade. Os ovinos serão submetidos a exame clínico antes da administração do oxalato de amônia, com realização de novo exame clínico se os animais apresentarem sinais clínicos da intoxicação. Serão avaliadas alterações de comportamento, de coloração de mucosas, dos movimentos respiratórios, ruminais e temperatura.

Serão colhidos 10 ml de sangue antes da administração do oxalato semanalmente no decorrer do experimento, as amostras serão colhidas por venopunção da jugular e acondicionadas em tubos sem anticoagulante para posterior centrifugação e separação do soro que ficará armazenado em temperatura de -80°C até a realização dos ensaios laboratoriais. Para dosagem

do hormônio da paratireoide (PTH) será encaminhado soro para laboratório de referência.

Para avaliação renal serão realizadas as dosagens séricas de creatinina, ureia e fósforo, além de cálcio ionizado e fosfatase alcalina (FA) e urinálise, dosagens urinárias de gama glutamil transferase (GGT), proteína, creatinina, fósforo e cálcio com posterior determinação da relação proteína/creatinina urinária. A concentração do cálcio ionizado será calculada por meio da obtenção dos analitos séricos: cálcio total, proteína total e albumina de acordo com a seguinte fórmula: Cálcio ionizado (mg/dL) = 6 x Ca - [A + (0,19 x Pt) / 3] / A + (0,19 x Pt) + 6, onde, Ca = Cálcio mg/dL Pt = Proteínas totais (g/dL) A = Albumina (g/dL).

A mensuração dos biomarcadores séricos e urinários (GGT, cálcio e fósforo) será realizada utilizando soro e kits reagentes específicos e seguirá os protocolos disponibilizados nos kits comerciais, com leitura realizada em analisador bioquímico automático (Cobas C111- Roche®), e a proteína urinária mensurada em bioquímico semi-automático (Spectron- Celer®). A coleta da urina será por micção espontânea.

A amostra de urina será submetida a exame físico-químico e avaliação do sedimento. Em relação às características físicas serão observados: cor, odor e presença de turbidez. A avaliação física utilizará tiras reagentes para identificar possíveis alterações no pH e nas concentrações de glicose, proteína, bilirrubina, sangue oculto, cetonas e nitrito. A densidade urinária será mensurada por meio de refratometria. Na sedimentoscopia será investigada a presença de leucócitos, hemácias e cilindros.

Os ovinos que morrerem serão necropsiados imediatamente após a morte, com a coleta fragmentos dos diversos órgão, que serão fixados em formol tamponado a 10%. Após a fixação, os fragmentos serão clivados, desidratados em álcool etílico absoluto, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e cortados em micrótomo à espessura de 5µ e os cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE). Fragmentos do rim e rúmen serão mantidos sem fixação e a cada duas horas um fragmento será colocado em formol, totalizando mais seis coletas, para avaliar a presença de cristais após 12 horas da morte do animal. Os ovinos que não manifestarem sinais clínicos ao final do experimento serão eutanasiados e amostras dos diferentes órgãos submetidas para processamento histológico conforme descrito anteriormente. Fragmentos de ossos da costela e do fêmur

serão descalcificados, utilizando-se solução aquosa de aldeído fórmico 14% e ácido nítrico a 3% e processados para exame histopatológico e corados com HE e Tricromico de Massom para evidenciar áreas de substituição de tecido ósseo por tecido fibroso.

Para auxiliar na investigação da injúria óssea dos ovinos após a morte as mandíbulas serão dissecadas e preparadas para radiografias de acordo com os procedimentos descritos por leite et al. (2004), sendo estas realizadas na projeção látero-lateral com exposição de 70 quilivolts (KV) e 80 miliamperes/segundo (mAs). O tempo de exposição de 0,06 segundos e a distância foco-filme de 1,10m. Após revelação pelo método de rotina (revelador, enxágue, fixador e lavagem), as radiografias permanecerão na secadora por cinco minutos. As radiografias serão interpretadas e descritas em protocolos individuais. Para a variável densidade óssea mandibular os achados radiográficos serão registrados conforme os respectivos escores: 0 – Sem alteração; 1 – Discreta diminuição de densidade óssea e pequenos pontos de rarefação óssea; 2 – Moderada diminuição de densidade e moderadas áreas de rarefação óssea; 3 – Severa diminuição de densidade óssea e grandes áreas de rarefação óssea.

Valores obtidos nas mensurações das variáveis serão tabulados para análise em planilha do Excel. A normalidade dos dados será verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. A avaliação estatística para comparação entre os grupos empregará o teste de Man-

Whitney para dados não paramétricos, para dados com distribuição normal o teste T de Student. A correlação e a quantificação da associação entre as variáveis utilizarão a correlação de Pearson para dados numéricos contínuos e para dados ordinais o teste de correlação de Spearman. Para todas as análises os resultados serão considerados significativos quando p<0,05.

5. ATIVIDADES E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

AÇÕES/ETAPAS (Ano: 2017-2018)	N	D	J	F	М	Α	М	J	J	Α	S	0	N	D
4.1Modelo experimental para						Х	Х	Х	Х	Х				
identificação do princípio tóxico de														
V. rubricaulis														
Revisão de literatura			Χ	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х		
Coleta de plantas						Х	Х	Х	Х	х				
Processamentos das amostras										Х	Χ	Χ		
Pesquisa do princípio tóxico														
4.2 Modelo experimental para								Х						
indução da intoxicação aguda em														
ovinos utilizando oxalato de														
Amônia.														
Revisão Bibliográfica			Χ	Χ	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	
Coleta de amostras sanguíneas e			Χ											
urina														
Processamento dos materiais			Χ											
colhidos														
Encefalopatia hepática secundária														
a lesões hepáticas crônicas														
causadas por Crotalaria incana em														
bovino														
Levantamentos dos dados						Х	Х	Х						
epidemiologicos														
Isolamento do AP's							Х	Х						
Processamento das amostras					х	х	х	х						
Redação dos Artigos e Relatórios			Χ	Χ	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	
Defesa da Tese													х	х

6. RESULTADOS ESPERADOS, PRODUTOS E AVANÇOS

Espera-se desenvolver modelos experimentais que permitam o esclarecimento de doenças com etiologia indeterminada e a identificação de princípios tóxicos de plantas. O conhecimento originado desta proposta permitirá elucidar números de casos de mortalidades em bovinos, e assim adorar medidas eficazes de prevenção e tratamento das mesmas, resultando em importantes

ganhos econômicos para a pecuária do MS. Considerando que mortalidades com características semelhantes ocorrem em toda região centro oeste, a elucidação da causa destas mortes representa um importante avanço para a pecuária nacional.

Também o desenvolvimento de uma metodologia para identificar os princípios tóxicos em plantas representa um avanço nesta área de conhecimento, pois menos da metade das plantas tóxicas do Brasil possuem princípios tóxicos conhecidos. Os produtos originados deste projeto, serão repassadas para os produtores e profissionais da área que atuam no campo com intuito de difundir o conhecimento adquirido para a comunidade buscando contribuir com estratégias de diagnósticos e prevenção de intoxicações através da produção científica como artigos científicos e técnicos na área de saúde e produção animal.

7. IMPACTOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS PARA MATO GROSSO DO SUL

O principal impacto esperado é agregar conhecimento inéditos no esclarecimento de mortalidades de bovinos de etiologia obscura e também na identificação de princípios tóxicos em plantas. Os principais benefícios destas informações, além da redução das perdas causadas por estas doenças são de caráter ambiental, social e de bem estar animal. Do ponto de vista ambiental, a atividade pecuária é desenvolvida há pelo menos 200 anos na região do pantanal, é considerada como um importante fator para a conservação ambiental e a viabilidade sócio econômica da região. Assim a redução das perdas econômicas relacionadas com a principal atividade econômica da região representa um importante impacto socioeconômico. O mesmo raciocínio se amplia ao conhecimento do princípio tóxico de plantas, com esta informação é possível que nas condições em que as concentrações dos princípios sejam maiores nas plantas e assim determinar fatores de risco para ocorrência de intoxicações. Em relação ao bem estar animal, uma vez conhecido o princípio tóxico estudos futuros podem ser desenvolvidos sem o uso de animais.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2520 ALLISON, M. J.; DAWSON, K. A.; MAYBERRY, W. R..; FOSS, J. G. 2521 *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.:oxalate-degrading anaerobes that 2522 inhabit the gastrointestinal tract. *Archives of Microbiology*, 141: 01-07, 1985.
- ALMEIDA, T.L.; BRUM, K.B.; LEMOS, R.A.A.; LEAL, C.R.B.; BORGES, F.A. Doenças de ovinos diagnosticadas no Laboratório de Anatomia Patológica Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (1996-2010). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33:21-29, 2013.
- BLANEY, B. J.; GARTNER, R. J. W.; HEAD, T. A. The effects of oxalate in tropical grasses on calcium, phosphorus and magnesium availability to cattle. *The Journal of Agricultural Science*, 99: 533-539, 1982.
- 2530 BRUM, K.B, PURISCO, E., LEMOS, R.A.A., RIET-CORREA, F. Intoxicação 2531 por Vernonia rubricaulis em bovinos em Mato Grosso do Sul. Pesquisa Veterinária 2532 Brasileira, v.22, n.3, p.119-128, 2002.
- BRUM, K. B.,HARAGUSH, M., LEMOS, R.A.A., RIET-CORREA, F., FIORAVANTI, M.C.S. Cr Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing Brachiaria decumbens containing the saponin protodioscin. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.27, n.1, p.39-42, 2007.
- 2538 BRUNE, H.; BREDEHORN, H.. On the physiology of bacterial degradation 2539 of calcium oxalate and the ability to utilize calcium from calcium oxalate in the pig. 2540 *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.16:214–236, 1961.
- BURROWS, G. E.; TYRL, R. J. Plants causing sudden death in livestock.

 Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 5:263–289, 1989.
- 2543 CRISPIM, S.M.A.; BARIONI JÚNIOR, W.; BRANCO, O. Valor nutritivo de 2544 *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* no Pantanal Sul-MatoGrossense. 2545 2003. 4p. Corumbá: Embrapa Pantanal (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 43).
- DAVIES, N. T. Anti-nutrient factors affecting mineral utilization. Proceedings of the Nutrition Society, 38: 121-128, 1979.
- DUNCAN, A. J.; FRUTOS, P.; YOUNG, S.A. Rates of oxalic acid degradation in the rumen of sheep and goats in response to different levels of oxalic acid administration. *Animal Science*, 65: 451-455, 1997.
- DUTRA, F., ROMERO, A., QUINTEROS, C., ARAUJO, R., SANTOS, C.G.
 Poisoning of sheep by Vernonia plantaginoides (Less.) Hieron in Uruguai. Journal
 of Veterinary Diagnostic Investigation, p.1-7, 2016.

- DÖBEREINER, J. TOKARNIA, C.H., PURISCO, E. Vernonia mollissima, planta tóxica responsável por mortandades em bovinos no sul de Mato Grosso. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.11, p.49-58, 1976.
- 2557 EI-KHODERY, S.; EI-BOSHY, M.; GAAFAR, K.; ELMASHAD, A. 2558 Hypocalcaemia in Ossimi Sheep Associated with Feeding on Beet Tops (*Beta vulgaris*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 32:199-205, 2008.
- GALIZA G.J.N.; LUCIANO A.P.; OLIVEIRA D.M.; PIEREZAN F.; DANTAS

 A.F.M; MEDEIROS R.M.T.;RIET-CORREA, F. Intoxicação por Portulaca elatior

 (*Portulacaceae*)
- em caprinos. Pesquisa Veterinária Brasileira, 31:465-470, 2011.
- GARDNER, S. Keeping an Eye on Calcium Balance in Australian Horse
 Nutrition. Horse Health Care Nutrition, Kentucky Equine Research, Brighton,
 Victoria, Australia, 2002.
- GORB, T. W.; MAKSAKOW, W. J.Influence of oxalate-rich feed on mineral metabolism and some physiological values in ruminants. *Archives* 12: 27–35, 1962.
- 2569 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em: 2570 http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagrop 2571 ecuaria/ Acesso em: 08/05/2016.
- JAMES, M. P.; SEAWRIGHT, A. A.; STEELE, D. P. Experimental acute ammonium oxalate poisoning of sheep. Australian veterinary journal, 47: 9-17, 1971.
- JAMES, L. F. Oxalate toxicosis. *Clinical Toxicology*, 5, 231–243, 1978.
- JAMES, M. P.; SEAWRIGHT, A. A.; STEELE, D. P. Experimental acute ammonium oxalate poisoning of sheep. Australian veterinary journal, 47: 9-17, 1971.
- JONES, R. J.; SEAWRIGHT, A. A.; LITTLE, D. A. Oxalate poisoning in animals grazing the tropical grass *Setaria sphacelata*. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 36:41–43, 1970.
- LEITE, J.E.B.; MAIA, F.C.L.; SOARES, P.C.; SANTOS, R.M.B.; NUNES, V.A.; MUNIZ, L. M. R. Aspectos radiográficos da mandíbula e crista interdentária de bovinos induzidos ao hiperparatiroidismo secundário nutricional. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, 11:1-2, 2004.

- LIMA JUNIOR, D.M., MONTEIRO, P.B.S., RANGEL, A.H.N., MACIEL,
- 2587 M.V., OLIVEIRA, S.E.O., FREIRE, D.A. Fatores anti-nutricionais para ruminantes.
- 2588 Acta Veterinaria Bras, v.3, n.4, p.132-143, 2010.
- LIBERT, B.; FRANCESCHI, V. R. Oxalate in crop plants. Journal of
- 2590 Agricultural and Food Chemistry, 35: 926–938, 1987.
- 2591 McINTOSH G.H., PULSFORD M.F., SPENCER W.G.; ROSSER H. A study
- of urolithiasis in grazing ruminants in south Australia. Aust. Vet. J, 50:345-
- 2593 350,1974.
- 2594 MCKENZIE, R. A.; GARTNER, R. J. W.; BLANEY, B. J.; GLANVILLE, R. J.
- 2595 Control of nutritional secondary hyperparathyroidism in grazing horses with
- 2596 calcium plus phosphorus supplementation. Australian Veterinary Journal 57: 554–
- 2597 557, 1981.
- 2598 McKENZIE, R.A.; SCHULTZ, K. Confirmation of the presence of calcium
- oxalate crystals in some tropical grasses. The Journal of Agricultural Science, v.
- 2600 100, n. 01, p. 249-250, 1983.
- 2601 MINSON, D. J., 1990: Forage in Ruminant Nutrition. Academic Press, San
- 2602 Diego, CA.
- 2603 MITTAL, R.D.; KUMAR, R. Gut-inhabiting bacterium Oxalobacter
- formigenes: role in calcium oxalate urolithiasis. Journal of endourology, 18:418-
- 2605 424, 2004.
- 2606 NUNES, S.G.; SILVA, J.M.; SCHENK, J.A.P. Problemas com cavalos em
- 2607 pastagem de humidícola. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1990. 4p.
- 2608 (EMBRAPA-CNPGC. Comunicado Técnico, 37).
- 2609 PPM- Produção Pecuária Municipal. 42:1-39, 2014. Disponível em:
- 2610 http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf.Ac
- 2611 esso em: 14.06.2016.
- 2612 PESSOA, C.R.M. et al. Importância econômica, epidemiologia e controle
- 2613 das intoxicações por plantas no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.33, n.6,
- 2614 p.752-758, 2013.
- 2615 PUOLI FILHO, J. N. P., ARRIGONI, C. C., DE BENI, M., & SILVEIRA, A. C.
- 2616 Effect of mineral supplement on calcium mobilization from bone of equine grazing
- 2617 Brachiaria humidicola. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 34: 873-878, 1999.

- 2618 RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. Veterinary 2619 medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.
- 2620 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. 2156p.
- 2621 RAHMAN, M.M.; NAKAGAWA, T.; NIIMI, M., FUKUYAMA, K.;
- 2622 KAWAMURA, O. Effects of feeding oxalate containing grass on intake and the
- 2623 concentrations of some minerals and parathyroid hormone in blood of sheep.
- Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 24:940-945, 2011.
- 2625 RAHMAN, M.M.; ABDULLAH, R.B.; WAN KHADIJAH, W.E. A review of
- 2626 oxalate poisoning in domestic animals: tolerance and performance aspects.
- Journal of animal physiology and animal nutrition, 97: 605-614, 2013.
- 2628 RIBAS, N. L., CARVALHO, R. I., SANTOS, A. C. D., VALENÇOELA, R. A.,
- 2629 GOUVEIA, A. F., CASTRO, M. B. D., LEMOS, R. A. Diseases of the nervous
- 2630 system of cattle in Mato Grosso do Sul, Brazil:1082 cases. Pesquisa Veterinária
- 2631 Brasileira, 33: 1183-1194, 2013.
- 2632 RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicação por plantas em
- ruminantes 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.
- 2635 RIET-CORREA; F. MEDEIROS, R.M.T.; TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER,
- 2636 J. Toxic plants for livestock in Brasil: economic impact, toxic species, control
- measures and public health and implications. In: PANTER, K.E.; WIERENGA, T.L.;
- 2638 PFISTER, J.A. (Ed) (Org): Poisonous Plants: global research and solutions:
- 2639 Wallingford: CAB International, 2007. p..2-14.
- 2640 RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C. Intoxicações por plantas e micotoxinas.
- In: RIET-CORREA, F.; SHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. (Ed)
- Doenças de Ruminantes e Equídeos. 3.ed. Pallotti:Fernovi, 2007. p.39-42.
- 2643 RODRIGUES, C. A. G., COMASTRI FILHO, J. A. A pecuária e as pastagens
- do Pantanal. Corumbá: EMBRAPA Pantanal; (Artigo de divulgação na mídia, n
- 2645 09). p. 3. 2001.
- 2646 SANTOS, S. A.; CRISPIM, S. M. A.; COMASTRI FILHO, J. A.; POTT, A.;
- 2647 CARDOSO, E. L. Substituição de pastagem nativa de baixo valor nutritivo por
- forrageiras de melhor qualidade no Pantanal. Embrapa Pantanal. Circular Técnica,
- 2649 62:4, 2005.

- SAVAGE, G. P.; VANHANEN, L.; MASON, S. M.; ROSS, A. B. Effect of cooking on the soluble and insoluble oxalate content of some New Zealand foods.

 Journal of Food Composition and Analysis, 13:201–206, 2000.
- 2653 SCHENK, M.A.M.; DE FARIA FILHO, T.T.; PIMENTEL, D.M.; THIAGO, L.R. 2654 L.D.S. Intoxicação por oxalatos em vacas lactantes em pastagem de 2655 sectária. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 17: 1403-1407,1982.
- SEAWRIGHT, A.A.; GROENENDYK, S.; SILVA, K.I. An outbreak of oxalate poisoning in cattle grazing Setaria sphacelata. Australian Veterinary Journal. 46:293:296, 1970.
- 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, MS, 2013
- 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.
- 2666 SWEENEY, H. J.; CUDDEFORD, D.An outbreak of hypocalcemia in ewes associated with dietary mismanagement. *Veterinary Record*, 120:114, 1987.
- TINDALL, J. R: Hypocalcemia in housed ewes. *Veterinary Record*, 118:518–519,1986.

2671

- TIRUNEH, R. Minerals and oxalate content of feed and water in relation with ruminant urolithiasis in Adea district, central Ethiopia. Revue de Medicine Veterinaire, 156: 272–277, 2004.
- 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 ovinos e bovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.3, n.2, p.45-52, 1983.
- TOKARNIA C.H., PEIXOTO P.V. & DÖBEREINER J. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.10, n. 1/2, p.1-10, 1990.

2682	TOKARNIA, C.H; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.;
2683	DÖBEREINER J. Plantas Tóxicas do Brasil para animais de produção. Rio de
2684	Janeiro: Helianthus, 2012. 566p.
2685	TOYANG, N.J., VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of
2686	plants of the genus Vernonia (Asteracea). Journal of Ethnopharmacology, v.146,
2687	p.681-723, 2013.
2688	WARD, G.; HARBERS, L.H.; BLAHA, J.J. Calcium-Containing Crystals in
2689	Alfalfa: Their Fate in Cattle 1, 2. Journal of dairy science, 62: 715-722, 1979.
2690	
2691	
2692	
2693	
2694	
2695	
2696	
2697	
2698	
2699	

2700 AUTORIZAÇÕES LEGAIS

2701 CEUA - UFMS - 884/2017 - ARTIGO 1



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modelo experimental para indução da intoxicação aguda e crônica por oxalato em ruminantes", registrada com o nº 884/2017, 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, do 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, na 8ª reunião ordinária do dia 19/09/2017.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	1°/09/2017 a 1°/03/2018	
Espécie/Linhagem/Raça	Ovis aries	
N° de animais	12	
Peso/Idade	35 kg / 24-48 meses	
Sexo	Machos / Fêmeas	
Origem	FAMEZ/UFMS	

Joice Stein Coordenadora da CEUA/UFMS Campo Grande, 20 de setembro de 2017.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA http://www.propp.ufms.br/ceua ceua.propp@ufms.br fone (67) 3345-7925

2702

2703

2704

2705

2706

2707

2708

CEUA – UFMS - 657/2015 ARTIGO 2 VERNONIA

2711

2710





CERTIFICADO

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.



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 fone (67) 3345-7186

2712

2713

2714

2715

2716

2717

2718

2719

2720

2721

2722

2723

Normas Revistas

1) Suplemento Pesquisa Veterinária Brasileira - ENDIVET 2018

Os trabalhos deverão ser submetidos em forma de RESUMO EXPANDIDO (até duas páginas digitadas) em português ou inglês, enviado no formato de editor de texto Word (.doc ou .docx). Podem ser enviadas Figuras (fotos ou gráficos) e Quadros (não usar o termo Tabela), com até no máximo 4 Figuras (no formato .jpg com resolução entre 300 a 600 dpi). As Legendas das Figuras devem ser enviadas no final do texto do resumo expandido. Os Quadros e as Figuras devem ser

anexados no campo específico em arquivos separados. Os resumos deverão conter dados relevantes para a compreensão do texto e serão avaliados pela Comissão Científica que poderá aprovar, solicitar correções ou rejeitar o resumo.

A Comissão Científica reserva-se o direito de alterar a escolha da modalidade (Pôster ou Apresentação Oral) a que o resumo foi submetido. Salientamos que os resumos que forem selecionados para apresentação oral, não serão expostos em forma de pôster.

Modelo para submissão

Panziera W., Konradt G., Bassuino D.M., Gonçalves M.A. & Driemeier D. 2016. **Timpanismo em bovinos, secundário à obstrução esofágica por** *Citrus limon (limão siciliano). Pesquisa Veterinária Brasileira 38(Supl.):00-00.* Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. E-mail: davetpat@ufrgs.br
Projeto realizado com auxílio do CNPq a Driemeier D., Pesquisador 1A CNPq (Proc.000000/2016-1)

Introdução: Timpanismo ruminal consiste na distensão acentuada do rúmen e retículo, devido a incapacidade do animal em expulsar gases produzidos durante o processo fisiológico da fermentação (Radostits et al. 2007). Essa condição está associada a perdas econômicas significativas, pois se relaciona com queda na produtividade e elevada mortalidade de animais gravemente afetados (Pagani 2008). O timpanismo pode ser ocasionado de forma primária ou secundária. O timpanismo primário, também chamado timpanismo espumoso, é decorrente do aumento na tensão superficial do líquido ruminal ou de sua viscosidade e da estabilidade de bolhas gasosas, que não se coalescem e ficam presas à ingesta na forma de espuma. As bolhas persistem por longos períodos dispersos na ingesta e apesar dos movimentos contínuos do conteúdo ruminal, estas não se desfazem, impossibilitando sua eliminação (Guedes et al. 2010). Essa forma de timpanismo é essencialmente nutricional e está associada a ingestão de algumas leguminosas ou dietas com excesso de concentrado. Dentre as leguminosas, destacam-se a alfafa e espécies do gênero *Trifolium* (Tokarnia et al. 2012).

Material e Métodos: Os dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos durante uma visita à propriedade onde os casos ocorreram. Cinco bovinos foram necropsiados nessa oportunidade e fragmentos de órgãos foram colhidos à necropsia, fixados em formol a 10%, processados rotineiramente para histologia e corados pela hematoxilina e eosina (HE).

Resultados: Cinco bovinos jovens, de um lote de 210, foram afetados por uma doença aguda fatal. Os casos ocorreram no mês de maio de 2015, em uma propriedade rural no município de Triunfo, Rio Grande do Sul, Brasil. Os bovinos desse lote estavam em campo nativo com boa oferta de gramíneas e há algum tempo eram suplementados com grande quantidade de resíduo de tangerina (Citrus reticulata) no cocho (Fig.1). Na última carga desse subproduto remetida para a propriedade, havia um grande número de limões sicilianos inteiros misturados acidentalmente ao resíduo. Os cinco bovinos afetados eram da raça Aberdeen Angus e tinham entre 12-24 meses de idade. Todos os animais apresentaram sinais clínicos caracterizados por apatia, anorexia, mucosas cianóticas, sialorreia, grave aumento de volume do flanco esquerdo, desconforto abdominal, acentuada dispneia e taquicardia, atonia ruminal, desidratação, decúbito e morte. O curso clínico variou entre 24 a 48 horas. Na necropsia, os cinco bovinos estavam acentuadamente desidratados, com a mucosa oral cianótica e o sangue escuro. Observou-se grave obstrução esofágica por limões nas porções: cranial (logo após a laringe [1/5]), porção medial (entrada do tórax [1/5]) e final (próximo ao cárdia [3/5]) (Fig.2). Nas áreas de oclusão, havia uma espessa linha de necrose e ulceração da mucosa esofágica. No tecido subcutâneo dessas regiões observaram-se áreas multifocais de hemorragia. O conteúdo ruminal dos bovinos estava seco e misturado com numerosos limões (Fig.3). No esôfago de dois animais foi possível visualizar intensa congestão da mucosa da porção cranial e média e palidez na porção caudal (linha de timpanismo). As lesões histológicas foram observadas principalmente no esôfago na região obstruída. Nas diferentes seções analisadas evidenciaram-se alterações degenerativas, necróticas e ulcerativas acentuadas no revestimento epitelial (Fig.4). Nessas áreas havia marcado infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico, grande quantidade de debris celulares, deposição de

material eosinofílico fibrilar (fibrina) e presença de numerosos agregados bacterianos cocoides basofílicos. Observou-se ainda degeneração, necrose e mineralização de fibras da camada muscular esofágica. Nos demais órgãos não foram observados alterações significativas.

Discussão: O diagnóstico de timpanismo secundário a obstrução esofágica aguda por limões nos bovinos desse trabalho foi baseado nos achados epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos. Em relação aos achados epidemiológicos, destaca-se a presença de grande quantidade de limões misturados acidentalmente ao resíduo de tangerina fornecido para os bovinos. Uma das principais causas de timpanismo ruminal secundário inclui a obstrução esofágica por alteração intraluminal, que constitui a oclusão aguda do esôfago normal por corpos estranhos (Borges & Moscardini 2007). Dentre as causas de obstrução, ressalta-se a ingestão de diversos alimentos como maçãs, laranjas, mangas, batatas, mandiocas, sabugos de milho e restos de hortifrutigranjeiros (Pagani 2008). Em alguns países dependendo da estação do ano a obstrução é mais comum com certos alimentos. Na Europa, por exemplo, no outono há maior incidência com beterraba e maçã (Rosenberger 1978). Semelhantemente ao descrito, os bovinos desse trabalho apresentaram oclusão esofágica aguda por limões e assim como os demais corpos estranhos, impediram a eructação física, mecanismo o qual é responsável pelo timpanismo secundário (Radostits et al. 2007). Os bovinos constituem a espécie mais suscetível ao desenvolvimento de obstrução esofágica por alimentos devido aos hábitos alimentares. Entre eles destacam-se a ingestão rápida de alimentos inteiros ou de pedaços grandes e o consumo máximo possível em um espaço curto de tempo. Esses constituem aspectos epidemiológicos importantes que podem ter contribuído para o desenvolvimento da oclusão esofágica nos bovinos do presente trabalho, já que os animais eram suplementados com grandes quantidades de alimento misturado com limões à vontade no cocho. Ocasionalmente pode haver casos de obstrução devido a ingestão de frutas a partir de árvores frutíferas, onde os bovinos não mastigam o alimento suficientemente antes de deglutir (Rosengerger 1978).

Conclusão: A associação dos dados epidemiológicos e clínicos permite um excelente diagnóstico presuntivo de obstrução esofágica intraluminal, que é confirmado através dos achados de necropsia com a presença do corpo estranho.

Agradecimentos: Aos fazendeiros que colaboraram com as informações prestadas.

Referências: Borges J.R.J. & Moscardini A.R.C. 2007. Timpanismo gasoso, p.336-343. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.2. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria. 694p. - Guedes R.M.C., Brown C.C. & Sequeira J.L. 2010. Sistema digestório, p.89-182. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), Patologia Veterinária. Roca, São Paulo. 892p. - Pagani J.A.B. 2008. Timpanismo em ruminantes. Revta Cient. Eletr. Med. Vet. 10:1-6. - Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Diseases of the alimentary tract, p.393-375. In: Ibid. (Eds), Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 2156p. - Rosenberger G. 1978. Schlundverstopfung (*Obstructio oesophagi*), p.202-211. In: Ibid. (Ed.), Krankheiten des Rindes. 2nd ed. Paul Parey, Hannover. 1403p. - Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que causam timpanismo agudo, p.145-146. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro. 586p.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de bovinos, timpanismo ruminal secundário, obstrução esofágica, patologia, distúrbio digestivo.

Legendas de Figuras

- Fig. 1. Bovinos alimentados com grande quantidade de resíduo de tangerina no cocho.
- Fig.2. Obstrução total por *Citrus limon* (limão siciliano) na porção final do lúmen esofágico, em bovino com timpanismo ruminal secundário. Note também a área extensa de necrose na mucosa do esôfago no local da oclusão.
- Fig.3. Conteúdo do rúmen com numerosos *Citrus limon* (limão siciliano) inteiros, em bovino com timpanismo ruminal secundário.
- Fig.4. Acentuada ulceração do epitélio de revestimento da mucosa do esôfago associado a grande quantidade de debris celulares, infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico e deposição de fibrina, em bovino com timpanismo ruminal em face da obstrução esofágica por *Citrus limon* (limão siciliano). Note também ocasionais agregados bacterianos basofílicos. HE, obj.4x.

2832 **2) Normas Acta Veterinaria**

INSTRUÇÕES RELATO DE CASO ASV - 2018

Acta Scientiae Veterinariae

RELATO DE CASO

Destinado para a descrição de quadros clínicos/cirúrgicos/ sintomatológicos/terapêuticos, etc. de natureza ou evolução incomum

INICIALMENTE os trabalhos são triados pelo Conselho Editorial. NÃO SERÃO aceitos aqueles FORA dos padrões específicos da ASV. O ABSTRACT (OBRIGATÓRIO: total mínimo de 3400 caracteres com espaços e máximo de 3900 cce, SEM contar keywords e descritores). É composto de três partes:

1. Background (seção curta com no máximo de 700 cce) que sempre terminará com o objetivo do relato. 2. Case: descrição detalhada. 3. Discussion: com as conclusões e perspectivas do relato.

IMPORTANTE: informar o endereço postal completo do *autor principal* para Correspondence. *Sempre* Informar a filiação (nome da Instituição com SIGLA e local) dos outros autores (nomes completos). Esta informação deve ser colocada abaixo da nomimata dos autores. *Nunca como nota de rodapé*. Fornecer DOIS e-mails (autores diferentes) para contato durante *avaliação* do trabalho e agilização dos trâmites necessários.

OBSERVAÇÃO: Primeiro Autor que já tem um RELATO de CASO em avaliação, só pode submeter novo trabalho após a publicação do mesmo.

CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS

Autoria: ASV se reserva o direito de LIMITAR a participação de no máximo OITO autores. O reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1) Efetiva e relevante participação no acompanhamento do caso; 2) Redação do artigo (análise e interpretação dos dados) e/ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual. Os auxiliares da equipe que não se encaixem nestes critérios prioritários podem figurar na seção de Acknowledgements. Os relatos serão publicados em ordem de aprovação final de todos os requisitos [conteúdo (texto e ilustrações) e correta formatação].

ATENÇÃO: O texto não aceitável (Abstract ou trabalho integral) passará OBRIGATORIAMENTE por revisão do inglês e a ser realizado por serviços especializados (opções RECOMENDADAS pela ASV).

Resumo dos Requisitos Técnicos:

- Apresentar o texto em fonte Times, tamanho 12, espaço duplo e margem de 2,5cm. NUNCA colocar nota de rodapé em nenhuma página
- \bullet Enumerar em ordem crescente, na margem esquerda, todas as linhas do trabalho.
- Imagens: As imagens devem ser digitalizadas em 300 dpi em CMYK (coloridas) e Gray Scale (tons de cinza), ao serem salvas deve ser selecionada a extensão TIFF. Podem ser enviadas em ARQUIVOS SEPARADOS por e-mail. Se necessário será solici-

tada a remessa das mesmas em CD/DVD. Para a digitalização pode ser usado qualquer programa de imagem, mas nunca enviar incorporado em documento Word. As fotografias feitas através de microscópio devem conter indicadores internos de escala. Os símbolos, flechas ou letras usados em fotomicrografias devem contrastar claramente com o fundo, com a escala (bar) inserida e a magnitude descrita na legenda. Para as fotos em câmera digital, a máquina deve ter resolução superior a 5 Megapixels (observar no momento de bater a foto se a câmera está configurada em resolução máxima). Nunca enviar as imagens com extensão jpg ou gif.

- Unidades de Medidas: Medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser expressas em unidades métricas (metros, gramas ou litros, ou seus múltiplos decimais). Astemperaturas devem ser dadas emgraus Celsius. Apressão sanguínea em milímetros de mercúrio. Todos os valores hematológicos ou bioquímicos devem ser apresentados em unidades do sistema métrico decimal de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (SI).
- Abreviações: devem ser evitadas e, se empregadas [só abreviatura padrão], definidas na primeira menção, salvo se forem unidades comuns de medida. Para nomes latinos binominais, abreviar o gênero após citação inicial, exceto quando iniciar frase.
- · Incluir permissão para reproduzir material previamente publicado.
- Anexar também termo de cessão dos direitos autorais (texto simples com assinatura dos coautores; escanear e enviar por email).

Para a submissão dos RELATOS ou comunicação com os Editores SOMENTE utilizar o e-mail:

actascivet-submission@ufrgs.br

IMPORTANTE: A taxa de publicação [R\$ 550,00] somente deverá ser paga (enviar por e-mail) após a revisão e aprovação final do trabalho. A publicação ocorrerá SOMENTE após o pagamento. A taxa única de fotolitagem colorida é de R\$ 170,00].

ESTRUTURA BÁSICA DOS TRABALHOS

PÁGINA INICIAL

- 1. Título não deve exceder 60 palavras. Title: com letras capitalizadas. Nomes completos de todos autores. Apresentar as filiações SEM informar cargo ou titulação dos autores.
- 2. ABSTRACT: na forma direta e no passado. OBRIGATÓRIO: total mínimo de 3400 caracteres com espaços e máximo de 3900 cce, SEM contar keywords e descritores). Écom posto de três partes:

 1. Background (seção curta com no máximo de 700 cce): destacando a importância do assunto e que sempre terminará com o objetivo do relato. 2. Case: descrição detalhada. 3. Discussion: com as conclusões e perspectivas do relato. Abstract deve ser preparado por tradutor/serviço reconhecidamente qualificado (anexar o comprovante). ASV se reserva o direito de RECUSAR texto-inglês considerado tecnicamente inadequado.

PÁGINAS SEGUINTES

- **3. INTRODUÇÃO:** Deve ser CURTA, clara e objetiva, contendo informações que justifiquem a importância do relato (originalidade) e restringindo as citações ao assunto específico. Sempre finalizar com o (s) objetivo (s) do trabalho. É obrigatório considerar o limite *MÍNIMO* de 700 cce e o MÁXIMO de 1700 c.c.e. Obs.: Pode ser similar ao texto do "background" [primeira parte do Abstract e que não deve ultrapassar 700 c.c.e]..
- **4. RELATO DO CASO:** destinado para a descrição de quadros clínicos/cirúrgicos/ sintomatológicos/terapêuticos, etc. de natureza ou evolução incomum. É obrigatória apresentação de no mínimo 2 figuras ilustrativas de tamanho padrão (7,5cm de largura), comparando várias situações [antes x pós-tratamento ou cirurgia, lesão macroscópica x achado histopatológico; lesão x cultivo macroscópico x aspecto microscópico, etc.].

<u>Tabelas</u>: se uma tabela tem poucas linhas e/ou colunas, tente organizar em frases dentro do corpo do texto. Ou seja, **não use tabelas pequenas para informações que podem ser alocadas no texto do artigo** (exemplo resultados de exames hematológicos e ou bioquímicos e respectivos padrões de referencia).

5. DISCUSSÃO: O conteúdo deve ser *interpretativo* e as hipóteses e especulações formuladas embasadas nos dados obtidos pelos aa. e, relacionadas ao conhecimento atual sobre o tema, fornecido por outros estudos. Nesta seção referenciar somente a literatura essencial. Concluir com as implicações dos achados e perspectivas.

Observação sobre as citações: Normalmente citadas no texto por números entre colchetes, correspondendo aos aa. ordenados e numerados por ordem alfabética. Exs.: [2], [7,9,16], [23-27,31,33,45-48]. Só quando for essencial citar o nome dos aa. no texto. Não citar nomes dos autores somente para cotejar dados obtidos em outros trabalhos similares. Observe as sugestões: A primeira descrição coube a Autor & Autor [3]...; Autor & Autor [32] iniciaram...; Autor et al. [18] em 1958... Os dados não publicados ou comunicações pessoais só devem aparecer no texto assim: (A.A.autor, comunicação pessoal, ano) e (C.D.autor & E.F. autor, dados não publicados); nestes casos informar antes das Referências o endereço completo ou e-mail dos aa.

- **6. MANUFACTURERS.** Quando pertinente indicar insumos e aparelhos DIRETOS no texto com números sobrescritos; os fabricantes (nome, cidade e país) deverão ser citados em Manufacturers.
- 7. Acknowledgements. Se necessários, devem ser sucintos e dirigidos para significativa assistência técnica, cooperação ou orientação recebida de colegas, etc. Quando se aplicar.
- 8. Declaration of interest.
- 9. REFERENCES: Atenção para todos os detalhes. Os trabalhos não serão analisados enquanto estiverem incompletas ou fora das normas. Relacionar as references em ordem alfabética e numerada, conforme os vários exemplos abaixo. Sequencia: Número / Referenciar sobrenome (letra maiúscula só a inicial) sem vírgulas e iniciais de todos aa. seguidas de ponto e separados por virgula entre cada autor (usar"&"para separar os últimos aa. / Ano da publicação. / Título do artigo. / Nome completo da revista em itálico (s/abreviação). / n. do volume (n. fascículo): pp-pp. Importante: poderão ser listados NO MÁXIMO dois resumos (Congressos, Simpósios, Salões ou workshops).

TRABALHOS

 \rightarrow COM DOIS AUTORES:

Spilki F.R. & Arns C.V. 2008. Vírus respiratório sincicial bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(3): 197-214.

→ COM VÁRIOS AUTORES:

Pereira S.A., Schubach T.M.P., Gremião I.D.F., Silva D.T., Figueiredo F.B., Assis N.V. & Passos S.R.L. 2009. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(4): 311-321.

Obs.1: A numeração das referências segue a prioridade da ordem alfabética dos sobrenomes dos diversos autores/ co-autores e não do ano da publicação. Exemplos:

- 7 Berlinguer F., Leoni G., Bogliolo L., Pintus P.P., Rosati I., Ledda S. & Naitana S. 2004.
- 8 Bernardi M.L., Cotinot C., Payen E. & Delouis C. 1996.
- 9 Bernardi M.L. & Delouis C. 1995.
- 10 Bernardi M.L. & Delouis C. 1996.
- 11 Bernardi M.L., Fléchon J-E, & Delouis C, 1996.
- 26 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Par-rilla J.L., Vazquez J.L. & Day B.N. 2002.
- 27 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A. & Vazquez J.L. 2001.
- 28 Martini R. L. 1998.
- 29 Matthijsa A., Hakze R., Potsma A. & Woelders H. 2000.
- 30 Matthijsa A., Harkema W., Engel B. & Woelders H. 2000.
- 68 Tervit H.R., Whittingham D.G. & Rowson L.E.A. 1972.
- 69 Thompson J.G. 1997.
- 70 Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.H. & Tervit H.R. 1995.
- $71 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Donnelly P.E. \& Tervit H.R. \ 1990.$
- 72 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A. & Tervit H.R. 1992.
- $73 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Wright R.W. \& Tervit H.R. \ 1991.$
- **Obs.2:** Para references com *idêntica ordenação dos aa.*, mesmo ano de publicação e em diferentes Revistas, dar prioridade de numeração para aquela que foi citada primeiro no trabalho. Se for na mesma Revista, priorizar a referência com numeração mais baixa.
- ightarrow EM VOLUME COM SUPLEMENTO:
 - Pier A.C., Cabañes F.J., Chermette R., Ferreiro L., Guillot J., Jensen H.E. & Santurio J.M. 2000. Prominent animal mycoses from various regions of the world. *Medical Mycology*. 38 (Suppl 1): 47-58.
- → EM FASCÍCULO SEM VOLUME:
 - **Turan L., Wredmark T. & Fellander-Tsai I. 1995.** Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clinical of Orthopedic.* (320): 110-114.

→ SEM VOLUME E SEM FASCÍCULO:

Schulman R.L. 2003. Insulin and other therapies for diabetes mellitus. *Veterinary Medicine*. April: 334-347.

→ EM FORMATO ELETRÔNICO:

Morse S.S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*. 1: 7-15. [Fonte: http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm].

→ IN PRESS/ Publicação ahead of print [mencionar as datas]:

Teifke J.P., Driemeier D.& KadenV. 2002. Arrest of metaphyseal ossification with classical swine fever. *Veterinary Record*. [in press].

→ COMPLETO EM EVENTO:

[Sempre com o N.° do evento (Cidade e País)]

Bortolozzo F.P., Uemoto D.A., Wentz I. & Pozzobon M.C. 1999.

Reproductive performance of gilts submitted to ar-tificial

insemination in different intervals before ovulation. In: Proceedings of the 4th International Conference on Board Semen Preservation (Beltsville, U.S.A.).pp.239-240.

→ EM COLEÇÃO OU SÉRIE:

Jellieff D.B. 1968. Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: Organizacion Mundial de la Salud. [Serie de Monografias, 53], 201p.

RESUMOS - No máximo DOIS

[Sempre com o N.º do evento (Cidade e País)]

→ PUBLICADO EM ANAIS:

Bisol J.F.W., Vieira M.J., Keller A., Mattos R.C. & Gregory R.M. 2000. Efeito da adição de antibióticos ao diluente de sêmen resfriado eqüino na fertilidade de éguas. In: Resumos do XII Salão de Iniciação Científica da UFRGS (Porto Alegre, Brasil). p.125.

→ PUBLICADO EM ANAIS COM VÁRIOS VOLS.:

Barcellos D.E.S.N., Razia L.E. & Borowski S.M. 2002. Microagglutination test detecting antibodies against *Brachyspira pilosicoli* [paper 537]. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society*. v.2. (Ames, U.S.A.). p.362.

→ PUBLICADO EM REVISTA:

Reischak D., Costa U.M., Moojen V. & Ravazzolo A.P. 1999. Ovine synovial membrane cell line permissive to *in vitro* caprine lentivirus replication [abstract A-097]. In: Virológica 99 (Curitiba, Brazil). *Virus Reviews & Research*. 4(1): 81-82.

• DISSERTAÇÕES / TESES

Machado M.L.S. 2001. Dermatófitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. 82f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)

 Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

• LIVROS

[Sempre com nome da Cidade: nome da Editora]

→ CAPÍTULO EM LIVRO COM AUTORIA:

Rodrigues J.L. 1982. Transferência Embrionária. In: Mies Filho A. (Ed). *Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial*. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, pp.710-720. [mencionar o Ed ouEds]

→ CAPÍTULO EM LIVRO SEM AUTORIA:

Solomon S.E. & Nascimento V.P. 1994. Hen's eggshell structure and function. In: *The Microbiology of the Avian Egg.* London: Chapman & Hall, pp.1-24.

→ CITAÇÃO DE LIVRO:

Bladh W. H. 1971. *Nuclear Medicine*. 2nd edn. New York: Mac Graw-Hill, 858p.

EXEMPLOS - PADRÃO ASV Exemplo 1

- 1 Benitah N. 2006. Canine nasal aspergillosis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 21(2): 82-88.
- 2 Cadwallader J.A., Goulden B.E., Baxter M., Wyburn R.S. & Alley M.R. 1973. Rhinitis and sinusitis involving Aspergillus fumigatus in a dog. New Zealand Veterinary Journal. 21(11): 229-233.
- 3 Davey T.N. 2003. Aspergilose. In: Tilley L.P. & Smith Jr. F.W.K. (Eds). Consulta veterinária em 5 minutos, espécies canina e felina. 2.ed. São Paulo: Manole, pp.460-461.
- **4 Day M.J. 2009.** Canine sino-nasal aspergillosis: parallels with human disease. *Medical Mycology*. 47(Suppl 1): s315-s323.
- 5 De Lorenzi D., Bonfanti U., Masserdotti C., Caldin M. & Furlanello T. 2006. Diagnosis of canine nasal aspergillosis by cytological examination: a comparison of four different collection techniques. *Journal of Small Animal Practice*. 47(6): 316-319.
- 6 Harvey C.E. & O'Brien J.A. 1983. Nasal aspergillosis and penicilliosis. In: Kirk R.W. (Ed). *Current Veterinary Therapy VIII*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., pp.236-240.
- 7 Hawkins E.C. 2006. Distúrbios da Cavidade Nasal. In: Nelson R.W. & Couto C.G. (Eds). *Medicina interna de pequenos animais*. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.219-230.
- 8 Johnson L.R., Drazenovich T.L., Herrera M.A. & Wisner E.R. 2006. Results of rhinoscopy alone or in conjunction with sinuscopy in dogs with aspergillosis: 46 cases (2001-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 228(5): 738-742
- 9 Kohn B., Kittner A., Werner H., Schmitz S., Rudolph R. & Brunnberg L. 2002. Nasal aspergillosis in dogs diagnosis and therapy. *Kleintierpraxis*. 47(7):415-426.
- 10 Lane J.G., Clayton-Jones D.G., Thoday K.L. & Thomsett L.R. 1974. The diagnosis and successful treatment of Aspergillus fumigatus infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. Journal of Small Animal Practice. 15(2): 79-87.